

Der Einfluss der MHC-Kompatibilität auf die suppressive Aktivität natürlicher $CD4^+CD25^+$ regulatorischer T-Zellen



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen
Fakultät III – Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julia Albrecht aus Straubing
Juli 2009

Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 01. Juli 2009

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. M. Edinger

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. A. Kurtz
	1. Gutachter (1. Prüfer):	Prof. Dr. S. Modrow
	2. Gutachter (2. Prüfer):	Prof. Dr. M. Edinger
	3. Prüfer:	Prof. Dr. R. Warth
	Ersatzprüfer:	Prof. Dr. E. Tamm

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	11
1.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation	11
1.2 Die T-Zellvermittelte Immunantwort	12
1.3 Regulatorische T-Zellen	16
1.3.1 Induzierte CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen	17
1.3.2 Natürliche CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorische T-Zellen	17
1.3.3 Mechanismen der suppressiven Aktivität von nTreg-Zellen	20
1.4 Die Rolle der nTreg-Zellen bei der Graft-versus-Host Erkrankung	23
1.5 Zielsetzung	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	28
2.1.2 Antikörper	29
2.1.3 Beads	31
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	31
2.1.5 Geräte	32
2.1.6 Versuchstiere	32
2.1.7 Medien, Puffer und Lösungen	33
2.2 Methoden	34
2.2.1 Ermittlung der Lebendzellzahl	34
2.2.2 Zellfärbung für durchflußzytometrische Analysen	34
2.2.2.1 Färbung von Oberflächenmolekülen	34
2.2.2.2 Färbung intrazellulärer Moleküle	35
2.2.2.3 FoxP3 Färbung	35
2.2.2.4 PMA/Ionomycin Stimulation für Zytokinanalysen	35
2.2.2.5 Durchflußzytometrische Messungen	36
2.2.3 Isolierung der verwendeten Zellpopulationen	37
2.2.3.1 Gewinnung von murinen Milzzellen	37
2.2.3.2 Isolierung einzelner Zellpopulationen aus murinen Milzzellen mittels magnetischer und durchflußzytometrischer Zellseparation	37
2.2.3.3 Gewinnung von murinen Knochenmarkzellen	39
2.2.3.4 T-Zelldepletion von murinen Knochenmarkzellen	40

2.2.4	Untersuchungen <i>In vitro</i>	40
2.2.4.1	Proliferationsmessung mittels ³ H-Thymidin-Einbau	40
2.2.4.2	Proliferationsmessung mittels CFSE-Markierung	41
2.2.4.3	Suppressionsexperiment nach polyklonaler Stimulation	41
2.2.4.4	Suppressionsexperiment im allogenen Stimulationsmodell („mixed lymphocyte reaction“ MLR).....	42
2.2.5	Untersuchungen <i>in vivo</i>	42
2.2.5.1	Konditionierung der Mäuse und Transplantation von Knochenmark und Milzzellen	42
2.2.5.2	Bewertung der GvHD	42
2.2.6	<i>In vivo</i> Biolumineszenz Imaging	43
2.2.7	Histologie	44
2.2.7.1	Einbettung von Organen und Gewebeschnitte.....	44
2.2.7.2	Hämatoxylin/Eosin Färbung.....	45
2.2.8	Statistik	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Phänotypisierung und Anreicherung von murinen nTreg-Zellen	46
3.2	Suppressive Aktivität von nTreg-Zellen <i>in vitro</i> nach polyklonaler Stimulation ----	48
3.3	Suppression von Tresp-Zellen nach allogener Stimulation	51
3.3.1	Suppression der Proliferation nach allogener Stimulation – Unterschiedliche Wirkung autologer und allogener nTreg-Zellen.....	52
3.3.1.1	Nachweis mittels ³ H-Thymidin-Einbau	52
3.3.1.2	Nachweis mittels CFSE-Verdünnungsassay	54
3.3.2	Vitalität allogener nTreg-Zellen in MLRs.....	60
3.3.3	Suppression der Zytokinexpression nach allogener Stimulation – Differenten Wirkung von autologen und allogener nTreg-Zellen.....	64
3.3.4	Suppression der CD137 und CD134 Expression von Tresp-Zellen durch autologe nTreg-Zellen	67
3.4	Protektive Wirkung autologer und allogener nTreg-Zellen im GvHD-Modell-----	68
3.4.1	Schutz vor akuter GvHD durch nTreg-Zellen des Effektorstamms nach haploidenten KMT	69
3.4.1.1	Wirkung kotransferierter autologer bzw. allogener nTreg-Zellen auf den Grad der Erkrankung und das Überleben der Tiere nach haploidenten KMT	71
3.4.1.2	Histopathologische Veränderungen.....	74
3.4.1.3	Zelluläre Zusammensetzung von Milz und Knochenmark in gesunden und GvHD erkrankten CB6F1 Rezipienten	76

3.4.2	nTreg-Zellen eines Drittspenderstamms bieten keinen Schutz vor letaler GvHD	81
3.4.2.1	Gewichtsverlauf, klinischer Score und Mortalität von DBA/1 Rezipienten nach allogener KMT	82
3.4.2.2	Histopathologische Veränderungen im Darm von GvHD-erkrankten Tieren.....	85
3.4.2.3	Unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung in Milz und Knochenmark in DBA/1 Rezipienten nach Kotransplantation von autologen oder allogenen nTreg-Zellen	86
3.4.3	Suppression der frühen Expansion von Tconv-Zellen durch autologe nTreg-Zellen	89
4	Diskussion	92
4.1	Suppression von Tresp-Zellen durch autologe nTreg-Zellen.....	92
4.2	Schutz vor akuter GvHD erfolgt nur durch autologe nTreg-Zellen	102
5	Zusammenfassung	112
6	Literatur	114
7	Anhang	135

Abkürzungsverzeichnis

β2m	β2-Mikroglobulin
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Allophycocyanin (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
APC	Antigen presenting cell (Antigenpräsentierende Zelle)
ATP	Adenosintriphosphat
CIITA	Class II major histocompatibility complex, transactivator (MHC-Klasse II Transaktivator)
cAMP	zyklisches (cyclic) AMP
CCD	Charge couple device
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester (Fluoreszenzfarbstoff)
Ci	Curie (Aktivität eines radioaktiven Stoffes)
cpm	Counts per minute
CSA	Cyclosporin A (Immunsuppressivum)
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte (zytotoxische T-Lymphozyten)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigene 4
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff)
DC	Dendritic cell (Dendritische Zelle)
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
FACS	Fluorescence activated cell scanning (Durchflußzytometrische Messmethode)
FasL	Fas-Ligand
FCS	Foetal calf serum (Fötales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
FK506	Tacrolimus (Immunsuppressivum)
FoxP3	Forkhead box P 3 (Transkriptionsfaktor)
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter) im Durchflußzytometer
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor)
GFP	Green fluorescent protein
GvL	Graft-versus-leukemia (Transplantat gegen Leukämie)

GvT	Graft-versus-tumor (Transplantat gegen Tumor)
GvH	Graft-versus-host (Transplantat gegen Empfänger)
GvHD	Graft-versus-host disease (GvH Erkrankung)
Gy	Gray (Energiedosis)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	Human leucocyte antigen
HvG	Host-versus-graft (Empfänger gegen Transplantat)
IBD	Inflammatory bowel disease (entzündliche Darmerkrankung)
ICER/CREM	Inducible cAMP early repressor/cAMP response element modulator
Ig	Immunglobulin
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IPEX	immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
kDa	Kilodalton
LAG3	Lymphocyte activation gene 3
LPS	Lipopolysaccharide
Lsg	Lösung
luc+ Zellen	Luziferase exprimierende Zellen
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
miHA	Minor histocompatibility antigene (Nebenhistokompatibilitätsantigen)
MLR	Mixed lymphocyte reaction (gemischte Lymphozytenkultur)
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
NEAA	Non-essential amino acids
NKT-Zellen	Natural killer T cell (natürliche Killer-T-Zelle)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
PB	Peripheral blood
PerCP	Peridinin Chlorophyll-a Protein (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cy7 (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
PI	Propidiumiodid
PLC- γ	Phospholipase C γ
PKC	Proteinkinase C
PMA	Paramethoxy Amphetamin
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung

Tconv-Zelle	konventionelle (conventional) T-Zelle
TCR	T cell receptor (T-Zell-Rezeptor)
TGF- β	Transforming growth factor β
Th3	T-Helfer-Typ 3 (regulatorische T-Zelle)
Th-Zelle	T-Helferzelle
TNF	Tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor)
TNFR	TNF-Rezeptor
Tr1-Zelle	regulatorische T-Zelle Typ1
Treg-Zelle	Regulatorische T-Zelle
nTreg-Zelle	natürliche Treg-Zelle
Tresp-Zelle	Responder-T-Zelle (konventionelle T-Zelle <i>in vitro</i>)

1 Einleitung

1.1 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation ist eine etablierte Methode zur Behandlung von malignen und einigen nicht-malignen Erkrankungen der Hämatopoese, die durch konventionelle Therapien nicht geheilt werden können. Vor Transplantation der hämatopoetischen Stammzellen wird der Patient strahlen- und/oder chemotherapeutisch sowie immunsuppressiv behandelt. Diese Vorbehandlung wird als "Konditionierung" bezeichnet und erfüllt mehrere Aufgaben. Die Myeloablation eliminiert die Empfängerhämatopoese und schafft Platz und ein geeignetes Mikromilieu für das Anwachsen der transplantierten Stammzellen. Bei Patienten mit malignen Erkrankungen soll diese Vorbehandlung zusätzlich residuelle Tumorzellen beseitigen. Die durch Zytostatika, Strahlentherapie und Immunsuppressiva induzierte Immunsuppression verhindert darüber hinaus die Abstoßung des Transplantats durch das adaptive Immunsystem des Empfängers. Für die allogene Stammzelltherapie werden meist hämatopoetische Stammzellen von einem HLA (*human leucocyte antigen*) -identen Familien- oder Fremdspender eingesetzt, wobei in beiden Fällen Spender und Empfänger genetisch nicht identisch sind (= allogene). Die hämatopoetischen Stammzellen werden entweder aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut gewonnen. Für die Verwendung des peripheren Blutes als Stammzellquelle werden CD34-exprimierende Stammzellen durch G-CSF-Stimulierung (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) aus dem Knochenmark der Spender mobilisiert und anschließend mittels Stammzellapherese aus dem Blut isoliert (1-4). Weder unmanipulierte Knochenmark- noch periphere Blutstammzellprodukte bestehen aus reinen Stammzellen, sondern enthalten darüber hinaus zahlreiche reife myeloische und lymphatische Zellen. Insbesondere die Kotransplantation von reifen Spender-T-Zellen spielt eine zentrale Rolle für den Erfolg der allogenen Stammzelltransplantation, da sie das Anwachsen der Stammzellen fördern, den Empfänger in der Posttransplantationsphase vor opportunistischen Infektionen schützen (z.B. vor CMV und EBV Infektionen (5, 6)) und vor allem durch die Erkennung von Minorantigenen auf hämatopoetischen Empfängerzellen zur immunologischen Eliminierung residueller gutartiger und maligner Blutzellen beitragen. Diese als "Spender-gegen-Hämatopoese" (*graft-versus-hematopoiesis*) und "Spender-gegen-Leukämie/Lymphom-Effekt" (*graft-versus-leukemia/lymphoma*, GVL) bezeichneten Phänomene sind hauptsächlich verantwortlich für die Überlegenheit der allogenen Transplantation in der Behandlung maligner Erkrankungen im Vergleich zu autologen Transplantationsverfahren

(7). Andererseits birgt die Kotransplantation reifer Spender-T-Zellen auch die Gefahr der Auslösung einer Spender-gegen-Empfänger Reaktion (*graft-versus-host-disease*, GVHD), bei der sich die Aktivität immunkompetenter Spender-T-Zellen nicht nur gegen die Empfängerhämatopoese richtet, sondern auch zur immunologischen Zerstörung von soliden Organen führt (8). Typische Zielorgane der akuten GVHD sind vor allem die Haut, die Leber und das Darmepithel der Patienten (8, 9). Diese immunologischen Transplantationskomplikationen sind für die hohe Morbidität und Mortalität dieses Therapieverfahrens hauptsächlich verantwortlich und führten dazu, dass der Einsatz der allogenen Stammzelltransplantation zu Recht auf die Behandlung lebensbedrohlicher Erkrankungen beschränkt wurde.

1.2 Die T-Zellvermittelte Immunantwort

Die Antigenerkennung durch T-Lymphozyten spielt eine zentrale Rolle für die Initialisierung und Regulierung einer spezifischen Immunantwort (10-12). T-Zellen können in zwei Subpopulationen unterteilt werden, die $CD4^+$ T-Helferzellen (Th-Zellen) und die zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen (13). $CD4^+$ Th-Zellen sezernieren Effektorzytokine, welche die Proliferation und Differenzierung von Zellen des Immunsystems anregen. Naive $CD4^+$ T-Zellen können zu unterschiedlichen Helferpopulationen differenzieren, die überwiegend durch ihr jeweiliges Zytokinprofil charakterisiert sind. Th1-Zellen produzieren pro-inflammatorische Zytokine wie Interferon (IFN)- γ , Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und Interleukin (IL)-2 und unterstützen eine Zell-vermittelte Immunität. Th2-Zellen exprimieren überwiegend IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13 und fördern eher die humorale Immunantwort (14). Die zytotoxischen $CD8^+$ T-Lymphozyten (CTLs) erkennen viral oder bakteriell infizierte Zellen und können über unterschiedliche Signalwege (Fas/FasL, Perforin/Granzyme) den programmierten Zelltod induzieren (10, 12).

T-Zellen müssen zur Ausübung der adaptiven Immunantwort, bei der infektiöse bzw. körperfremde Organismen, Partikel und Substanzen zielgerichtet aufgespürt und zerstört werden, über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) aktiviert werden. Der TCR ist ein Heterodimer aus je einer α - und β -Polypeptidkette, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden und zusätzlich im Komplex mit den CD3-Heterodimeren ϵ/δ und γ/ϵ und dem CD3-Homodimer ζ/ζ in die Zellmembran eingelagert sind. Der TCR besitzt eine konstante und eine variable Region. Die TCR-Spezifität für ein bestimmtes Antigen wird durch die variable Region der TCR-Ketten definiert. Die Gene der α - und β -Ketten bestehen aus mehreren Regionen, für die im Genom unterschiedliche Gensegmente kodieren. Die α -Ketten werden von variablen

(V), *joining*- (J) und konstanten (C) Gensegmenten, die β -Ketten von V-, J-, *diversity*- (D) und C-Gensegmenten kodiert. Die Möglichkeit, auf nahezu jedes Fremdanigen zu reagieren, beruht auf der Vielfalt des TCR-Repertoires innerhalb der T-Zellpopulation. Diese wird während der Entwicklung der Thymozyten durch somatische Rekombination der separaten V-, J- (α -Kette) bzw. V-, D-, J- (β -Kette) Gensegmente erreicht (10, 12, 15). Jeder T-Zell-Klon erkennt spezifisch ein Antigen, welches ihm als antigenes Peptid präsentiert wird.

Die spezifische Antigenerkennung durch T-Zellen als zentrales Ereignis der zellulären Immunantwort beruht grundsätzlich auf dem Kontakt zwischen antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wie z.B. Dendritischen Zellen (DCs), B-Zellen und Makrophagen/Monozyten, und den T-Lymphozyten. Die Präsentation erfolgt durch spezifische Membranglykoproteine, den sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHCs, HLA beim Menschen, H-2 bei der Maus) (11, 16). Beim Menschen liegen die HLA-kodierenden Gene auf dem kurzen Arm von Chromosom 6, die MHC-Gene der Maus liegen auf Chromosom 17. Die Organisation der MHC-Gene ist bei beiden Spezies ähnlich (17-19). Die MHC-Moleküle werden in 2 Klassen unterteilt (20). MHC-Klasse I Moleküle bestehen aus zwei Polypeptidketten, einer 45kDa schweren α -Kette, die im MHC-Locus codiert ist und einer nicht-kovalent gebundenen Kette (12 kDa), dem β 2-Mikroglobulin (β 2m), die durch ein monomorphes Gen außerhalb des MHC (beim Menschen auf Chromosom 15, bei der Maus auf Chromosom 2) kodiert wird (21, 22). Die α -Kette besteht aus fünf Domänen: 2 peptidbindenden Domänen (α 1 und α 2), einer immunglobulin-ähnlichen Domäne (α 3), einer Transmembranregion und der zytoplasmatischen Domäne (19). Es existieren drei klassische Genloci für die α -Kette des MHC-Klasse I Moleküls, die beim Menschen mit HLA-A, -B und -C und bei Mäusen mit H-2K, D, und L bezeichnet werden. Diese drei Loci gehören zu den am stärksten polymorphen Regionen des Genoms, mit nahezu 1500 Allelen (23). Die unterschiedliche Kombination der MHC-Allele (den sogenannten Haplotyp) wird bei der Maus mit einem hochgestellten Kleinbuchstaben gekennzeichnet (z.B. H-2^b). MHC-Klasse I Moleküle werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren zellinterne Antigene. Hierzu werden die Proteine im Proteasom durch Aminopeptidasen zu 8-11 Aminosäuren langen Peptiden abgebaut, bevor sie in das Endoplasmatische Retikulum transportiert werden. Dort binden sie an die α -Kette des MHC-Klasse I Moleküls, stabilisieren es dadurch und ermöglichen so den Transport an die Zelloberfläche (24-26). Das Peptid bindet in der Furche, die durch die α 1- und α 2-Domänen gebildet wird und eine geschlossene Konformation aufweist. Diese besteht aus zwei segmentierten α -Helices, die auf einem Faltblatt aus acht β -Strängen liegen. In der peptidbindenden Furche liegen die ausgeprägten Polymorphismen vor, welche für die Antigenerkennung von T-Zellen von wesentlicher Bedeutung sind (20, 27, 28). Das Peptid ist in einer gestreckten Konformation über 2-3 Aminosäureseitenketten am N- und C-

Terminus in dem Spalt verankert. Diese sogenannten Verankerungsreste binden an die polymorphen Aminosäuren des MHC-Klasse I Moleküls (20, 29, 30).

Die MHC-Klasse II Moleküle bestehen aus je einer α - und β -Kette, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind und zur Ausbildung des peptidbindenden Spalts beitragen. Bei beiden Ketten handelt es sich um Glykoproteine, die im MHC-Locus codiert sind. Die klassischen MHC-Klasse II Gene werden beim Menschen HLA-DR, -DP, und -DQ und bei der Maus I-A und I-E genannt (19). Während in den MHC-Klasse I Molekülen vor allem die $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ - Domänen einen starken Polymorphismus vorweisen, sind in den MHC-Klasse II Molekülen die β -Ketten hoch polymorph (31). MHC-Klasse II Moleküle präsentieren hauptsächlich Peptide exogener Antigene, die zuvor durch Endozytose (Phago- oder Pinozytose) aufgenommen wurden. Die endozytierten Proteine werden durch endosomale Proteasen in 12-19 Aminosäure lange Peptide abgebaut und binden in den sogenannten MHC-Klasse II Kompartimenten an MHC-Klasse II Moleküle. Mit diesen werden sie an die Zelloberfläche transportiert und den $CD4^+$ T-Zellen präsentiert (32). Bestimmte APCs sind auch in der Lage exogene Antigene im Komplex mit MHC-Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Man spricht in diesem Fall von der sogenannten Kreuzpräsentation und diese ist essentiell für die Induktion einer Immunantwort gegen Mikroorganismen, die APCs selbst nicht infizieren (33). Das Peptid liegt in ausgestreckter Konformation längs der Bindungsfurche, dessen Enden weit geöffnet sind, und wird von Peptidseitengruppen festgehalten (34). MHC-Klasse II Moleküle werden fast ausschließlich auf sogenannten „professionellen“ APCs wie DCs, B-Zellen und Monozyten/Makrophagen exprimiert. Im Gegensatz zu humanen T-Lymphozyten, exprimieren murine T-Zellen keine MHC-Klasse II Moleküle, da sie aufgrund der Hypermethylierung der CIITA-Promotorregion III nicht in der Lage sind den MHC-Klasse II Transaktivator (CIITA) zu transkribieren (35, 36).

Durch die Bindung des TCRs an den MHC bildet sich eine immunologische Synapse zwischen T-Zellen und APCs aus. Diese besteht aus einer zentralen Ebene, in der sowohl der TCR als auch die Korezeptoren CD4 und CD8 an den MHC binden. Zusätzlich sind weitere Rezeptoren, wie z.B. CD2 und CD28 auf T-Zellen und CD58 bzw. CD80/CD86 auf APCs, sowie verschiedene zytoplasmatische Signalmoleküle (Lck, Fyn, ZAP-70, Proteinkinase C θ und MEK Kinase 2) enthalten (37). Der äußere Ring besteht aus den Adhäsionsmolekülen LFA-1 (auf der T-Zellseite) und seinem Liganden ICAM-1 (auf den APCs), welche für eine zusätzliche Stabilisierung der Bindung zwischen T-Zelle und APC verantwortlich sind (37, 38).

Die Bindung des TCR an einen MHC-Peptidkomplex und die Kostimulation über CD28 führen zur Aktivierung von zwei intrazellulären Signalnetzwerken, der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalkaskade und dem Inositol-Phospholipid-Stoffwechselwege.

Letzterer wird durch Phospholipase C γ (PLC- γ) in Gang gesetzt. Dieses generiert die beiden Sekundärbotenstoffe Diacylglycerol, welches über die Proteinkinase C (PKC) die Aktivierung von NF- κ B induziert, und Inositoltriphosphat, welches für den Ca²⁺-Einstrom verantwortlich ist. Durch den Ca²⁺-Einstrom kommt es zur Aktivierung von Calcineurin, das NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), einen Transkriptionsfaktor des IL-2 Promotors, dephosphoryliert und dadurch aktiviert. Für die Bindung innerhalb der Promotorregion muss NFAT mit dem AP-1 Protein einen Transkriptionskomplex bilden, um die IL-2 Gentranskription zu initiieren (39). Das AP-1 Protein wird durch ein CD28 vermitteltes Signal über die Phosphatidylinositol-3 Kinase und den MAPK-Signalweg aktiviert. Analog zur Produktion von IL-2 wird die Synthese der α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25) induziert (40). CD25 bildet zusammen mit einer β - (CD122) und γ - (CD132) Kette, den hochaffinen IL-2 Rezeptor. Ruhende Zellen exprimieren eine Form des IL-2 Rezeptors, die nur aus der β - und der γ -Kette besteht und dadurch nur eine mäßige Affinität für IL-2 besitzt. Erst durch die Verbindung zum Trimer weist der Rezeptor maximale Affinität für seinen Liganden auf. IL-2 wirkt einerseits autokrin und stimuliert so die klonale Expansion der T-Zelle, kann aber auch zusätzlich B-, NK-Zellen und Makrophagen aktivieren (41). In Abwesenheit des Interaktionspartners AP-1 wird sowohl die IL-2 Synthese als auch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie z.B. IFN- γ und TNF inhibiert (42). Folglich kommt es zur Anergie der T-Lymphozyten, wenn nach einer Peptiderkennung ohne zusätzlichen Kostimulus die Aktivierung weiterer Signalwege ausbleibt, während für eine vollständige T-Zellantwort sowohl die antigenspezifische Aktivierung über den TCR, als auch antigenunspezifische Signale über sogenannte kostimulatorische Moleküle erforderlich sind.

Die kostimulatorischen Moleküle und ihre Liganden lassen sich in zwei Rezeptorfamilien einteilen. Die Mitglieder der CD28:B7-Familie, wie z.B. CD28 und sein Gegenspieler, das „*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*“ (CTLA-4), sind Transmembran-Glykoproteine und gehören zur Immunglobulin-Superfamilie (43). Während CD28 konstitutiv auf CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird, ist die CTLA-4 Expression aktivierungsabhängig (44). Eine Ausnahme bilden hierbei die regulatorischen T-Zellen, auf die später genauer eingegangen wird. CD28 und CTLA-4 konkurrieren um die Liganden CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf APCs. Die Bindung des kostimulatorischen Moleküls CD28 an seinen Liganden führt zu einer Verminderung des Schwellenwerts für die T-Zellaktivierung, zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (IL-2, IFN- γ , TNF) und klonalen Expansion von T-Zellen (45, 46). Im Gegensatz dazu bindet CTLA-4 mit einer höheren Affinität an CD80/CD86 und vermittelt inhibitorische Signale an T-Lymphozyten (47). CTLA-4 defiziente Mäuse entwickeln ein letales Lymphozytenproliferationssyndrom (48), was darauf hindeutet, dass CTLA-4 eine wichtige Rolle in der Regulierung der T-Zellantwort spielt.

Die zweite Familie der kostimulatorischen Moleküle wird als TNF/TNFR-Superfamilie bezeichnet, zu denen z.B. CD154 (CD40L), CD134 (OX-40) und CD137 (4-1BB) gehören (49). CD154 wird auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert und führt nach Bindung mit CD40 (auf APCs) zur Aktivierung beider Zellpopulationen. CD134 gibt ebenfalls kostimulatorische Signale an Effektor-T-Zellen ab und inhibiert die Suppressorfunktion von natürlichen regulatorischen T-Zellen. Dieses Mitglied der TNF/TNFR Familie kann sowohl auf aktivierten konventionellen T-Zellen, als auch auf naiven regulatorischen T-Zellen exprimiert werden (50). Das kostimulatorische Molekül CD137 wird vor allem auf aktivierten T- und NK-Zellen exprimiert und spielt, ähnlich wie CD134, eine wichtige Rolle in der T-Zell-Effektorfunktion, Expansion und der zellvermittelten Immunantwort (51). All diese Signalwege sind nicht auf die Interaktion zwischen T-Zellen und professionellen APCs begrenzt, sondern werden auch durch T-T-Zellkontakt, T- und B-Zellinteraktionen und Bindungen zwischen T-Zellen und nichtlymphoiden Zellen in der Peripherie (Endothelzellen, Parenchymzellen) induziert (10-12).

In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass kostimulatorische Moleküle als Angriffsziel für die Hemmung der allogenen Immunreaktion und somit der Induktion von Toleranz nach Transplantation dienen können. Dazu wurden z.B. monoklonale Antikörper gegen CD80 und CD86 oder das rekombinante Fusionsprotein CTLA-4Ig verwendet (52, 53). Aber auch die Blockade der CD134- und CD137-vermittelten Signalwege führt zum Langzeitüberleben von Spendertransplantaten und zur Inhibierung der allogenen Immunantwort von konventionellen T-Zellen (54, 55).

In der Erhaltung der Homöostase sind neben diesen aktivierenden Interaktionen auch regulatorische Systeme notwendig, welche die Lymphozytenproliferation und Differenzierung ebenfalls beeinflussen. Hierbei sind die inhibitorischen Zytokine IL-10 und „*transforming growth factor β* “ (TGF- β) wichtige Mediatoren für eine Suppression der Immunantwort. Neben ihrer direkt suppressiven Wirkung können diese Zytokine in T-Zellen jedoch auch regulatorische/suppressive Funktionen hervorrufen (56). Derart generierte Suppressorzellen werden als induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg-Zellen) bezeichnet, der Mechanismus der Weiterverbreitung regulatorischer Funktion als „infektiöse Toleranz“.

1.3 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) verhindern das Überschießen einer Immunantwort und tragen zum Erhalt der immunologischen Selbsttoleranz und Immunhomöostase bei. Man unterscheidet hauptsächlich zwischen iTreg-Zellen, die sich in

der Peripherie aus konventionellen T-Zellen (Tconv-Zellen) entwickeln, und natürlichen Treg-Zellen (nTreg-Zellen), die im Thymus als separate Zellpopulation gebildet werden.

Neben den CD4⁺ iTreg- und nTreg-Zellen, auf die im Folgenden noch genauer eingegangen wird, gibt es auch unter den CD8⁺ T-Lymphozyten Zellen mit suppressiver Funktion. Die CD8⁺CD28⁻ iTreg-Zellen werden durch wiederholte Antigenstimulation in Gegenwart von TGF- β generiert (57, 58). In einem Zell-Zell-Kontakt abhängigen Mechanismus nehmen sie regulatorischen Einfluss auf APCs, indem sie entweder ihre Expression kostimulatorischer Moleküle wie z.B. CD80/CD86 oder CD54 vermindern oder sie komplett eliminieren (59). Des Weiteren findet man Treg-Subpopulationen unter den natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) (60), den CD4/CD8⁻T-Zellen (61) und den $\gamma\delta$ T-Zellen (62).

1.3.1 Induzierte CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen

Aufgrund spezieller Zytokinprofile können iTreg-Zellen phänotypisch und funktionell in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden.

Eine dieser Populationen sind die sogenannten Typ1 regulatorischen T-Zellen (Tr1-Zellen), die durch Aktivierung über ihren TCR in Gegenwart von IL-10 gebildet werden und sowohl *in vivo* als auch *in vitro* T-Zellantworten unterdrücken können. Nach Aktivierung proliferieren sie nur in geringem Maße und produzieren große Mengen IL-10, aber auch IFN- γ , TGF- β und IL-5, dagegen kaum IL-2 oder IL-4 (63). Tr1-Zellen können zellkontaktunabhängig die Aktivierung von naiven und Gedächtnis-T-Zellen supprimieren und sowohl Th1- als auch Th2-Immunantworten verhindern (64, 65).

Eine zweite Subpopulation regulatorischer T-Zellen sezerniert große Mengen an TGF- β und nur in geringem Maße IL-10 und IL-4. Diese Zellen werden als T-Helfer-Typ 3 (Th3) bezeichnet und werden durch geringe Antigenmengen, welche mit der Nahrung aufgenommen werden, induziert. Sie sind ebenfalls in der Lage sowohl Th1- als auch Th2-Antworten zu modulieren und die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen zu unterdrücken (66).

1.3.2 Natürliche CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen

1995 beschrieben Sakaguchi et al. eine Population von CD4⁺ T-Zellen, die konstitutiv CD25 exprimiert und eine starke regulatorische Funktion *in vitro* und *in vivo* aufweist (67). Diese mittlerweile nTreg-Zellen benannte Population wurde bisher in der Maus, der Ratte, in Primaten und im Menschen beschrieben und machen etwa 5-10% aller peripheren CD4⁺ T-

Zellen aus (67, 68). Sie spielen eine unentbehrliche Rolle für den Erhalt der Selbsttoleranz (69, 70) und für die Immunhomöostase (71). Eine veränderte Anzahl oder defekte Suppressorfunktion von $CD4^+CD25^+$ nTreg-Zellen wurde mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Darüber hinaus können nTreg-Zellen auch Immunantworten gegen Infektionen (72), Tumore (73) und bei allogenen Organ- bzw. Knochenmarktransplantationen beeinflussen (74). Untersuchungen *in vitro* konnten zeigen, dass nTreg-Zellen sowohl die Aktivierung und Proliferation, als auch die Zytokinproduktion von $CD4^+$ und $CD8^+$ Tconv-Zellen inhibieren (75, 76). Des Weiteren supprimieren sie die Proliferation, Immunglobulinproduktion und den Immunglobulin-Klassenwechsel von B-Lymphozyten (77). Zusätzlich unterdrücken sie die zytotoxische Funktion von NK- und NKT-Zellen (77) und verhindern die Reifung und Funktion von DCs (78). Zur Ausübung ihrer suppressiven Aktivität müssen nTreg-Zellen über ihren TCR aktiviert werden. Sobald sie aktiviert wurden, können nTreg-Zellen auf antigenunspezifische Weise supprimieren („*bystander suppression*“). Dies bedeutet, dass nTreg-Zellen auch Tconv-Zellen mit einer unterschiedlichen Antigenpezifität unterdrücken können (79).

Die $CD4^+CD25^+$ nTreg-Zellen werden im Thymus aus doppelt negativen $CD4^-/CD8^-$ Vorläuferzellen gebildet und durch kortikale Epithelzellen positiv selektioniert (80, 81). Die Entwicklung der $CD4^+CD25^+$ nTreg-Zellen ist in Relation zu nicht-suppressiven Thymozyten während der Mausontogenese verzögert, so dass sie erst drei Tage nach der Geburt nachgewiesen werden können. Eine Thymektomie bis Tag drei nach Geburt führt zu organspezifischen Autoimmunerkrankungen und überschießenden Entzündungsreaktionen, welche durch eine exogene Zufuhr von $CD4^+CD25^+$ nTreg-Zellen verhindert werden können (82). Die Entwicklung von thymusstämmigen nTreg-Zellen kann bezüglich der Notwendigkeit eines TCR-Signals in zwei Entwicklungsstufen eingeteilt werden. In der ersten Entwicklungsstufe werden nTreg-Vorläuferzellen durch ihre TCR-Spezifität positiv selektioniert und es kommt durch die TCR-Stimulation zur Hochregulation von CD25. Die Oberflächenexpression von CD25 bleibt bei nTreg-Zellen bestehen und ist somit ein charakteristischer Unterschied zu den Tconv-Zellen, welche nur während ihres doppelt-negativen Entwicklungsstadiums für kurze Zeit CD25 exprimieren (83). Die unmittelbare $CD25^+CD4^+CD8^-$ nTreg-Vorläuferpopulation enthält ein ähnliches TCR-Repertoire wie die peripheren nTreg-Zellen und benötigt für ihre voranschreitende Entwicklung keine weitere TCR-Bindung (76). Während der TCR-unabhängigen Entwicklungsphase der thymusstämmigen nTreg-Zellen wird der Transkriptionsfaktor FoxP3 hochreguliert. Es wird postuliert, dass diese Hochregulation durch die Zytokine IL-2 und IL-15 über den STAT-5-Signalweg initiiert wird (81).

Neben ihrer Entwicklung, ist auch die Funktion der thymusstämmigen $CD4^+CD25^+$ nTreg-Zellen weitgehend abhängig von der Aktivität des Transkriptionsfaktors FoxP3 (69, 76). Der

Verlust der FoxP3 Funktion hat einen Mangel bzw. Defekt von nTreg-Zellen zur Folge und führt im Menschen zum X-chromosomal vererbten Syndrom mit Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie (IPEX), das ohne Knochenmarktransplantation (KMT) meist bereits im Kleinkindalter letal verläuft. Ein vergleichbares Syndrom durch eine Mutation im murinen FoxP3 liegt bei der *scurfy* Maus vor (84, 85). In diesen Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass der Autoimmunphänotyp durch eine *frameshift*-Mutation im *foxp3* Gen verursacht wird, die zu einem sofortigen Abbau der FoxP3 Moleküle führt (85). FoxP3 bindet an DNA Sequenzen in der Promotorregion von Genen wie IL-2, IL-4 und IFN- γ und unterdrückt dort als Repressor die NFAT und NF- κ B induzierte Zytokintranskription (86). Es konnte gezeigt werden, dass der NFAT-FoxP3 Komplex für die suppressive Aktivität von nTreg-Zellen benötigt wird und außerdem die Expression von CD25 und CTLA-4 hochreguliert (87). Über die Repressorfunktion hinaus kann FoxP3 auch als Aktivator fungieren und die Expression von nTreg-spezifischen Genen induzieren (z.B. Prdm1, Irf4, CREM und Helios) (88). Weitere molekulargenetische Arbeiten zeigten, dass FoxP3 ein nTreg-spezifisches Expressionsprofil stabilisiert, das zunächst FoxP3-unabhängig entsteht. Für die Aufrechterhaltung des Phänotyps und der suppressorischen Funktion der nTreg-Zellen ist somit eine permanente und stabile Expression von FoxP3 notwendig (88).

Ein weiterer charakteristischer und konstitutiv exprimierter Marker von nTreg-Zellen ist CTLA-4. Die Bedeutung von CTLA-4 für die suppressive Aktivität von nTreg-Zellen ist zur Zeit noch umstritten (89). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Blockade von CTLA-4 zu einer verminderten suppressiven Aktivität von nTreg-Zellen führt (90-93). Andererseits zeigen andere Arbeiten, dass weder die Abwesenheit von CTLA-4, noch seine Blockade, die suppressive Funktion von nTreg-Zellen beeinträchtigen (94-96).

CD134 (OX-40) wird von CD4⁺CD25⁺ nTreg-Zellen ebenfalls konstitutiv exprimiert. Es gibt bisher kontroverse Studien zum Einfluss des Rezeptors auf die Entwicklung und Funktionalität von nTreg-Zellen. Frühere Untersuchungen an Wildtyp und CD134^{-/-} Tieren postulierten eine verminderte Entwicklung und suppressive Funktion von nTreg-Zellen in Abwesenheit von CD134 (97). Untersuchungen mit CD134^{-/-}FoxP3-GFP *Knockin*-Mäusen konnten dagegen zeigen, dass CD134 entbehrlich ist für die Entwicklung und suppressive Aktivität der Zellen (50). Allerdings führt eine zusätzliche Stimulation von CD4⁺FoxP3⁺ nTreg-Zellen über CD134 zum Verlust ihrer suppressiven Aktivität, was mit einer Abnahme der FoxP3 Expression in den Zellen einhergeht (50).

Im Gegensatz hierzu fördert CD137 (4-1BB), ein weiteres Mitglied der TNF/TNFR Familie, das ebenfalls auf nTreg-Zellen exprimiert wird, die Expansion von nTreg-Zellen, die hierbei sowohl ihren Phänotyp als auch ihre Funktionalität beibehalten (98).

CD4⁺CD25⁺ nTreg-Zellen sind *in vitro* anerg, d.h. sie zeigen eine verminderte Proliferation nach TCR-Stimulierung (76, 99). Die Hypoproliferation der nTreg-Zellen ist u.a. Folge der

fehlenden Transkription und Sekretion von IL-2 (100). Da sie es selbst nicht produzieren können, benötigen sie eine exogene Versorgung mit IL-2 oder auch IL-15, um zu expandieren (95, 100-102). Die Beziehung zwischen der Anergie und der suppressiven Aktivität von nTreg-Zellen ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Anfängliche Studien zeigten, dass die Anergie durch TCR-Aktivierung mit gleichzeitiger IL-2 Gabe und Stimulierung über CD28 aufgehoben wird und den gleichzeitigen Verlust der suppressiven Aktivität zur Folge hat (103, 104). Nach Beendigung einer solchen Kostimulation über IL-2 oder anti-CD28 wird die ursprüngliche Anergie wiedererlangt (105). Im Gegensatz hierzu zeigten Studien von Shevach et al., dass die Gabe von exogenem IL-2 nTreg-Zellen zur Proliferation befähigt und zugleich die IL-2 mRNA in Tresp-Zellen stark unterdrückt ist (100).

1.3.3 Mechanismen der suppressiven Aktivität von nTreg-Zellen

Die Aufklärung des Suppressionsmechanismus von nTreg-Zellen hat in den letzten Jahren signifikante Fortschritte gemacht. Kenntnisse über die regulatorische Funktion der nTreg-Zellen geben dabei nicht nur Einblicke in die Kontrolle der peripheren Toleranz, sondern bieten auch die Möglichkeit, diese Regulationsmechanismen therapeutisch zu nutzen. Die zuvor beschriebenen Moleküle und Signalwege spielen dabei eine wichtige Rolle für das Verständnis der suppressiven Aktivität auf unterschiedliche Zielzellen und Immunantworten.

Ursprünglich wurde vermutet, dass die suppressive Wirkung von nTreg-Zellen ausschließlich auf eine direkte Interaktion mit Tconv-Zellen zurückzuführen ist. Dies beruhte auf *in vitro* Studien, in denen nachgewiesen wurde, dass ein direkter Zell-Zell-Kontakt notwendig ist, da in Kokulturen, in denen nTreg- und Tconv-Zellen durch eine semipermeable Membran getrennt waren, keine Suppression beobachtet wurde (75, 102, 104).

Mittlerweile ist bekannt, dass nTreg-Zellen eine Vielzahl von Mechanismen zur Suppression nutzen und auf unterschiedliche Zielzellen wirken können. Ein Signalmolekül ist der CTLA-4-Rezeptor, der durch Bindung an CD80/CD86 zur Induktion der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in APCs führt. IDO katalysiert die Umwandlung von Tryptophan in Kynurenin und weitere proapoptotische Metabolite. Somit kann die T-Zellaktivierung und Proliferation auf zwei unterschiedliche Arten inhibiert werden. Zum einen wirkt sich die Tryptophan-Verarmung negativ auf die Stimulierbarkeit der Tconv-Zellen aus, zum anderen können Tconv-Zellen über die Kynurenin-Ausschüttung der DCs in Apoptose getrieben werden (106-109). CTLA-4 kann zusätzlich die CD80/CD86 Expression auf DCs herunterregulieren und außerdem die Reifung der DCs inhibieren, was die Aktivierung weiterer Tconv-Zellen

verhindert (110, 111). Ein weiterer CTLA-4-abhängiger Suppressionsmechanismus ist die Induktion der Transkriptionsfaktoren ICER/CREM (*inducible cAMP early repressor/cAMP response element modulator*) in Tconv-Zellen. ICER/CREM bilden mit NFAT einen dominanten inhibitorischen Komplex innerhalb des IL-2 Promotors und führen somit zur Inhibierung der IL-2 Synthese (112, 113).

Kürzlich wurde postuliert, dass nTreg-Zellen die T-Zell-Effektorfunktion durch die direkte Übertragung durch cAMP inhibieren. Der Transport von cAMP in die CD4⁺ Tconv-Zellen soll hierbei über *Gap Junctions* erfolgen (114).

Als weiterer Nukleosid-abhängiger Suppressionsmechanismus von nTreg-Zellen wurde die Generierung von perizellulärem Adenosin beschrieben, das über A_{2A}-Rezeptoren immunsuppressiv auf Tconv-Zellen wirkt. Hierbei wird extrazelluläres ATP von dem Ektoenzym CD39, das konstitutiv auf FoxP3⁺ nTreg-Zellen exprimiert wird, durch Hydrolyse inaktiviert. Das gebildete AMP wird durch CD73, welches sowohl von nTreg-Zellen als auch von Tconv-Zellen exprimiert wird, in Adenosin umgewandelt (115-118).

In verschiedenen Studien konnte eine Inhibierung der Reifung und Immunstimulation von DCs durch die Bindung von LAG3 (*lymphocyte activation gene 3*) beobachtet werden. LAG3 ist ein CD4-Homolog, das mit hoher Affinität an MHC-Klasse II Moleküle bindet und von nTreg-Zellen nach Aktivierung exprimiert wird. Der Einsatz blockierender Antikörper gegen LAG3 führt *in vivo* zu einer verminderten suppressiven Aktivität der nTreg-Zellen, und LAG3^{-/-} nTreg-Zellen zeigen reduzierte regulatorische Aktivität *in vitro* (119). Die Bedeutung von LAG3 für die suppressive Aktivität der nTreg-Zellen *in vivo* muss dennoch weiter untersucht werden, da LAG3^{-/-} Mäuse keine Anzeichen von Autoimmunerkrankungen aufweisen (120).

Alle bisher erwähnten suppressiven Mechanismen setzten Zell-Zell-Kontakt oder zumindest unmittelbare Nähe von nTreg- und Zielzelle voraus. Passend dazu haben neutralisierende Antikörper gegen suppressive Zytokine, wie z.B. IL-10 und TGF-β, oder der Einsatz von Tconv-Zellen, die aufgrund von Rezeptormutationen nicht auf solche Zytokine antworten können, *in vitro* keinen Einfluss auf die suppressive Funktion von nTreg-Zellen (75, 104, 121, 122). Allerdings zeigte eine Vielzahl von Studien, u.a. in einem Allergiemodell, dass IL-10 oder TGF-β zur suppressiven Aktivität von nTreg-Zellen *in vivo* beitragen (72, 123, 124). Dagegen konnten Kearley et al. ebenfalls in einem Allergiemodell zeigen, dass die suppressive Wirkung der nTreg-Zellen *in vivo* zwar IL-10 abhängig ist, die Produktion von IL-10 durch nTreg-Zellen aber keine Rolle spielt. Vielmehr wird durch die Interaktion mit nTreg-Zellen die IL-10-Produktion in Tconv-Zellen induziert, wodurch die Erkrankung kontrolliert wird (125). Gleiches gilt für die Kontrolle bestimmter Infektionen wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis* (126). Auch hier muss TGF-β und IL-10 nicht von nTreg-Zellen produziert

werden. Im Kolitismodell der Maus, scheinen hingegen sowohl die IL-10- als auch die TGF- β -Produktion von nTreg-Zellen für den maximalen Schutz entscheidend zu sein (123, 127).

Als ein weiterer löslicher Mediator der nTreg-Zellfunktion wurde kürzlich IL-35 beschrieben. IL-35 ist ein neu entdecktes Mitglied der IL-12 Zytokinfamilie. Es setzt sich aus dem Epstein-Barr Virus-induzierten Gen 3 (Ebi3) und IL12p35 zusammen, welche beide bevorzugt in murinen FoxP3⁺ nTreg-Zellen exprimiert werden. nTreg-Zellen, die aus Ebi3^{-/-} oder aus IL-12 α ^{-/-} Mäusen isoliert wurden, zeigten *in vitro* eine signifikant reduzierte regulatorische Aktivität und waren *in vivo* nicht in der Lage, die homöostatische Proliferation von Tconv-Zellen zu unterdrücken bzw. einen Schutz vor IBD (*inflammatory bowel disease*) aufzubauen (128).

Bezüglich möglicher Suppressionsmechanismen wird auch immer wieder die konstitutiv hohe Expression von CD25 auf nTreg-Zellen untersucht. CD25 bindet verfügbares IL-2 und könnte dieses aktivierten T-Zellen kompetitiv entziehen, wodurch deren Proliferation gehemmt würde (75, 129, 130). In anderen Studien wurde jedoch bezweifelt, dass der IL-2-Verbrauch durch nTreg-Zellen alleine ausreicht um die suppressive Wirkung dieser Zellen zu erklären. So konnte gezeigt werden, dass sowohl nTreg-Zellen aus IL-2^{-/-} als auch aus IL-2 α ^{-/-} Mäusen suppressive Aktivität aufwiesen und die Zugabe von anti-CD25 Antikörper unter optimalen Stimulationsbedingungen keinen Einfluss auf die Suppression der nTreg-Zellen hat (131-133).

Letztlich werden auch zytolytische Mechanismen für nTreg-Zellen diskutiert. Obwohl sie prinzipiell nicht als zytolytisch gelten (101, 102), konnte in Expressionsanalysen von murinen nTreg-Zellen eine Hochregulation von Granzym B detektiert werden (134). Ebenso zeigte Gondek et al., dass Granzym B^{-/-} nTreg-Zellen *in vitro* eine verminderte suppressive Aktivität aufwiesen und die Granzym B vermittelte Suppression Perforin-unabhängig zur Apoptose in Tconv-Zellen führt (135). Gestützt wurden diese Ergebnisse auch durch eine Studie von Zhao et al., in der gezeigt wurde, dass nTreg-Zellen B-Lymphozyten durch einen Granzym B- und Perforin-abhängigen Mechanismus abtöten (136). Neben der Zytolyse durch Granzym B und Perforin wurde postuliert, dass nTreg-Zellen die Apoptose von Tconv-Zellen auch durch andere Signalwege, wie z.B. über Galektin-1, induzieren können (137).

All diese Beobachtungen zeigen, dass der relative Beitrag von IL-10 und TGF- β - wie der aller anderen Mechanismen - zur nTreg-vermittelten Suppression, stark von den untersuchten Erkrankungen und experimentellen Systemen abhängt.

1.4 Die Rolle der nTreg-Zellen bei der Graft-versus-Host Erkrankung

In der allogenen Stammzell-Transplantation werden zwei Formen der Alloreaktion unterschieden, die *host-versus-graft* (HvG, Empfänger gegen Transplantat) und die GvH-Reaktion. Die HvG Reaktion manifestiert sich als Abstoßung des Transplantats, die durch adäquate Konditionierung und ausreichende Immunsuppression in aller Regel vermieden werden kann. Die GvHD nach allogener KMT ist hauptsächlich für die hohe Morbidität und Mortalität dieses Therapieverfahrens verantwortlich. Sie wird durch reife Spender-T-Zellen im Transplantat verursacht, die MHC-Klasse I und II Moleküle des Empfängers und/oder darin präsentierte Peptide (miHA) erkennen. Nach Aktivierung und Expansion führen diese alloreaktiven T-Zellen zur Zerstörung typischer Zielorgane wie Haut, Leber und Darm. Alloreaktive T-Zellen können fremde MHC-Antigene auf zwei unterschiedliche Arten erkennen, über die direkte und die indirekte Alloantigenerkennung (**Abb. 1.1**).

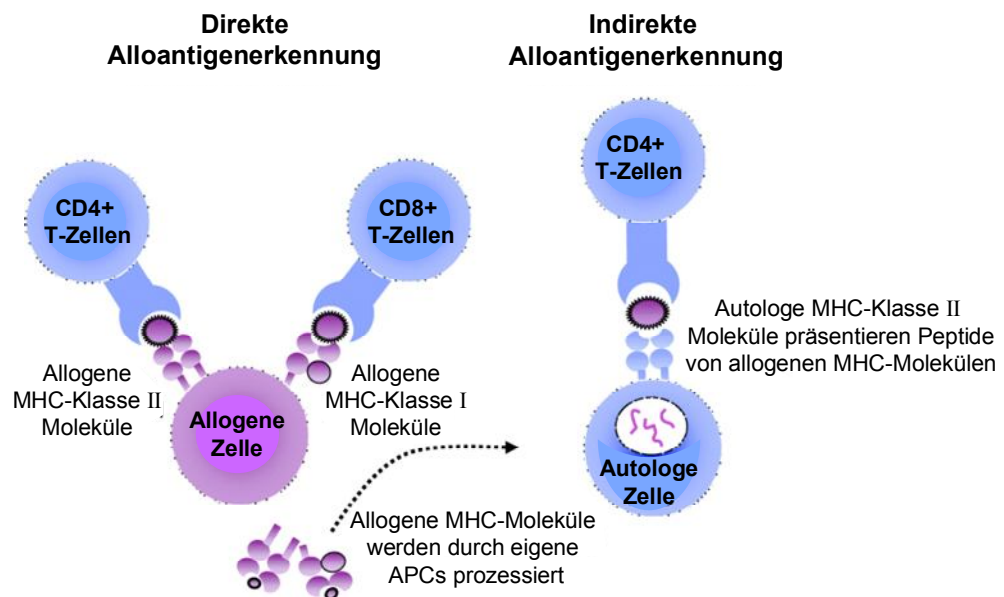


Abb. 1.1: Direkte und Indirekte T-Zell Alloantigenerkennung. Modifiziert nach (138).

Bei MHC-differenten Transplantationen erkennen ca. 1-10% aller T-Zellen direkt allogene MHC-Moleküle, die hauptsächlich von Empfänger-APCs präsentiert werden (MHC-dominante Erkennung) (20, 138). Somit kann es auch bei Transplantationen zwischen zwei Mauseinzuchtstämmen, die sich nur in ihrem MHC unterscheiden (z.B. B10 [H2^b] → B10.BR

[H2^k]), zur Entwicklung von GvHD kommen. Bei der indirekten Alloantigenerkennung (Peptid-dominante Erkennung) werden dagegen MHC-Moleküle des Empfängers von APCs des Spenders aufgenommen, prozessiert und den Spender-T-Zellen über eigene (autologe) MHC-Moleküle präsentiert (138, 139). Dabei dominieren CD4⁺ T-Zellen, die spezifisch MHC-Klasse II gebundene allogene Peptide erkennen (140).

Bei Transplantation von Zellen, deren MHC-Moleküle identisch mit denen des Empfängers sind, sind Differenzen der Nebenhistokompatibilitätsantigene (Minor Histocompatibility Antigene = miHA) für die Entstehung von Transplantationskomplikationen verantwortlich (138, 141). miHA sind Peptide polymorpher Proteine des Empfängers, die über MHC-Moleküle der Spender oder Empfänger APCs den Spender T-Zellen präsentiert werden (142). Bisher wurden erst einige von vermutlich unzähligen Minorantigenen in Mensch und Maus charakterisiert (143-148). Perreault et al. konnten allerdings in einem Mausmodell zeigen, dass schon ein einziges immundominantes miHA bei einem ansonsten völlig identischen genetischen Hintergrund ausreicht, um eine GvHD auszulösen (149).

Die GvHD tritt in akuter oder chronischer Form auf, die sich in ihrem zeitlichen Auftreten, dem klinischen Bild und ihrer Pathophysiologie unterscheiden. Per Definition entsteht die akute GvHD bis Tag 100 nach Transplantation, wohingegen die chronische Form als ein autoimmunähnliches Syndrom frühestens 100 Tage nach Transplantation auftritt. Nach dem derzeitigen Verständnis kann die Pathophysiologie der akuten GvHD in drei sequenzielle Phasen eingeteilt werden (150).

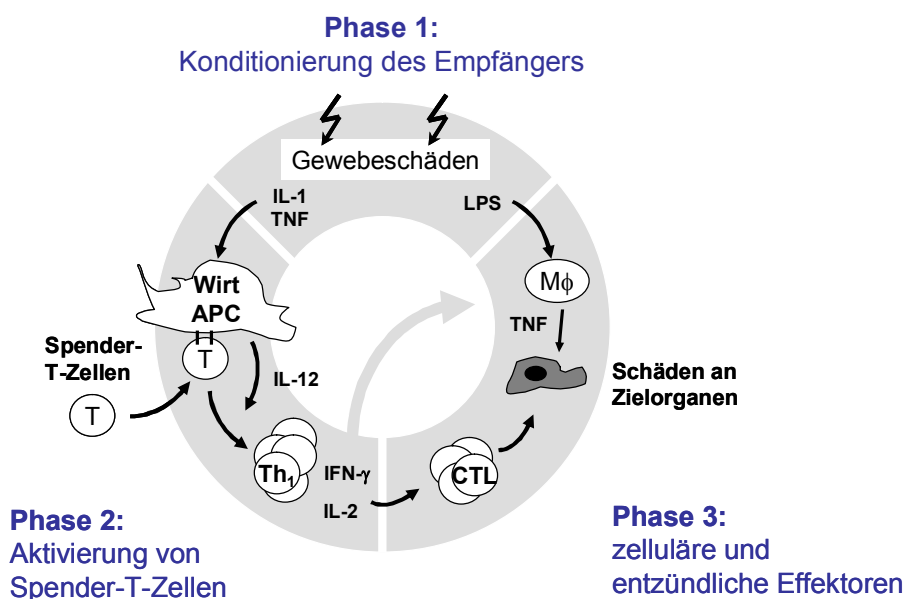


Abb. 1.2: Entstehung der GvHD nach allogener KMT. Modifiziert nach Hill und Ferrara (1999).

In der ersten Phase kommt es durch Konditionierung des Empfängers zu Gewebeschäden, was zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und TNF führt. Dadurch werden DCs des Empfängers aktiviert, die ihrerseits die Spender-T-Zellen aktivieren. Des Weiteren kommt es durch Schädigungen der Mucosa im Darm zur Ausschüttung von bakteriellen oder mikrobiellen Lipopolysacchariden (LPS) und CpGs. Dies aktiviert wiederum Monozyten/Makrophagen, welche daraufhin TNF sezernieren (151, 152). In der zweiten Phase werden die transplantierten Spender-T-Zellen durch die aktivierten APCs des Empfängers direkt durch dessen allogene MHCs (bei MHC-differenter Transplantation) oder durch Minorantigene aktiviert. Danach kommt es zu einer starken Expansion der alloreaktiven Zellen und zur Sekretion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine wie IFN- γ , IL-12 und IL-2, die ihrerseits CTLs, Monozyten/Makrophagen und NK-Zellen aktivieren. Die dritte Phase der akuten GvHD ist eine komplexe Kaskade verschiedener Effektormechanismen, an der unterschiedliche Effektorzellen und Moleküle beteiligt sind. Entzündete Gewebe exprimieren nach Stimulation durch pro-inflammatorische Zytokine inflammatorische Chemokine, die für die Migration von Effektorzellen zu den GvHD-Zielorganen (T-Zellen, Neutrophile und Monozyten) verantwortlich sind (153). Aktivierte CTLs, NK-Zellen und Monozyten/Makrophagen verstärken die Gewebeschädigung durch Ausschüttung inflammatorischer Zytokine (z.B. TNF oder IL-1) und zytotoxische Effektormechanismen (151, 154). Dies führt zu weiterer Zytokinausschüttung und es entsteht ein Teufelskreis im Sinne eines sogenannten „Zytokinsturms“ (150, 155). Das Risiko für die Auslösung einer GvHD ist also abhängig von der Intensität der Konditionierung, der Zahl reaktiver T-Zellen im Transplantat und den MHC- bzw. miHA-Unterschieden zwischen Spender und Empfänger.

Um eine akute GvHD zu verhindern, wird nach Transplantation routinemäßig eine medikamentöse Immunsuppression durchgeführt. Die Unterdrückung der Aktivierung von Spender-T-Zellen kann durch Gabe von Immunsuppressiva, wie z.B. Cyclosporin A, Tacrolimus, Myophenolat oder Methotrexat erreicht werden. Cyclosporin A und Tacrolimus sind als Calcineurin-Inhibitoren und unterbinden die IL-2 Genexpression. Als alternative Strategie zum Schutz vor akuter GvHD wurde u.a. auch die Entfernung von Spender-T-Zellen aus dem Transplantat durch *ex vivo* T-Zelldepletion untersucht. Es zeigte sich allerdings, dass es dadurch gehäuft zu Transplantatabstoßungen und zum Verlust des schützenden GvL-Effekts kam, so dass das Risiko eines Rezidivs durch residuelle maligne Zellen erhöht wurde. Tierexperimentell werden derzeit auch eine Reihe anderer Strategien untersucht. Die Induktion von Anergie in Spender-T-Zellen durch Blockade kostimulatorischer Moleküle könnte die funktionelle Aktivität gegen Infektionserreger und maligne Zellen unter Umständen bewahren. So blockiert die Gabe von löslichem CTLA-4-Ig die Interaktion von CD80/CD86 mit CD28 und führt dadurch teilweise zu einer Unterdrückung

der akuten GvHD (156, 157). Auch die Blockade weiterer Signalwege, wie z.B. CD40/CD154, CD137/CD137L und CD134/CD134L führte in Mäusen einen Schutz vor GvHD (54, 158, 159). Die Inhibition der T-Zellaktivität ist jedoch nur bedingt effektiv, da CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterschiedliche kostimulatorische Signalwege für ihre Aktivierung benötigen (150). Eine weitere Strategie zur Unterdrückung der T-Zellfunktion ist die Gabe von anti-FasL und anti-TNF Antikörpern, wodurch die zytolytische Funktion von CTLs unterdrückt wird (160).

Ein weiterer Ansatz zur Prophylaxe der akuten GvHD ist die Kotransplantation von nTreg-Zellen. Tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass die Depletion von nTreg-Zellen aus der Spender-T-Zellpopulation vor allogener KMT die GvH-Reaktion verstärkt und beschleunigt. Umgekehrt führt die Kotransplantation einer hohen Anzahl von frisch isolierten nTreg-Zellen des Spenders zu einem effektiven Schutz vor GvHD (74, 161, 162), ohne dass der erwünschte GvL-Effekt zwangsweise verloren geht (163). Diese von den Arbeitsgruppenleitern erstmals beschriebene Strategie steht im Zentrum der experimentellen Arbeit dieser Dissertation.

1.5 Zielsetzung

Tierexperimentelle Studien von Hoffmann et al. (161) zeigten, dass der adoptive Transfer von nTreg-Zellen des Spenders im komplett MHC-differenten KMT-Modell vor letaler GvHD schützt. Im Unterschied hierzu bewirkten nTreg-Zellen des Empfängerstamms unter gleichen Bedingungen keinen Schutz vor GvHD. Als mögliche Erklärung wurde der Einfluss der MHC-Kompatibilität zwischen nTreg- und Tconv-Zellen auf die suppressive Funktion von nTreg-Zellen diskutiert. Diese Hypothese soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll die suppressive Wirkung von nTreg-Zellen nach allogener Stimulation auf autologe und allogene Tconv-Zellen *in vitro* untersucht werden. Hierfür sollen in gemischten Lymphozytenkulturen Tconv-Zellen, nTreg-Zellen und Stimulatorzellen von MHC-differenten Mausstämmen verwendet und systematisch variiert werden. Für die Quantifizierung der suppressiven Aktivität soll neben der Proliferation auch die Zytokinsekretion und die Expression von kostimulatorischen Molekülen analysiert werden. Ferner soll das Überleben der nTreg-Zellen in den Kokulturen überprüft werden, um ihre Eliminierung durch alloreaktive CD8⁺ T-Zellen auszuschließen.

Im zweiten Teil der Arbeit soll in unterschiedlichen murinen GvHD-Modellen der Schutz vor GvHD durch kotransplantierte autologe und allogene nTreg-Zellen untersucht werden.

Hierfür wird zum einen ein F1-Modell verwendet, bei dem Empfänger-mäusen der F1-Generation GvHD auslösende Tconv-Zellen eines der beiden MHC-differenten Elternstämme transplantiert werden. Anschließend wird der protektive Effekt von nTreg-Zellen desselben oder des anderen Elternstamms analysiert. In einem weiteren allogenen KMT-Modell soll die Frage geklärt werden, ob nur nTreg-Zellen des Knochenmark-Spenderstamms oder auch eines Drittspenderstamms die Effektorfunktion von Tconv-Zellen unterdrücken können. Der suppressive Effekt von nTreg-Zellen soll anhand klinischer Untersuchungen (Gewichtsveränderung, klinischer GvHD-Score und Überleben) sowie anhand zellulärer und histologischer Analysen überprüft werden. Schließlich soll die räumliche und zeitliche Verteilung von transplantierten Tconv-Zellen in Anwesenheit von MHC-identen oder MHC-differenten nTreg-Zellen nach allogener KMT bestimmt werden. Zu diesem Zweck wird die *in vivo* Biolumineszenzbildgebung zur Echtzeitanalyse konventioneller T-Zellen in lebenden Versuchstieren eingesetzt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien, Reagenzien	Hersteller
2-Mercaptoethanol (Lsg., 50 µM)	Gibco, Auckland
³ H-Thymidin (37 MBq)	Hartmann Analytics, Krefeld
Ammoniumchlorid (NH ₄ CL)	Sigma-Aldrich, Steinheim
CFSE (Lsg. 5 mM)	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Cortrim E-Saft	Ratiopharm, Ulm
Cytofix/Cytoperm	BD Pharmingen, San Diego
DAPI (Lsg., 1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA-Dinatriumsalz (0,1 mM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entellan (Eindeckmedium)	Merck, Darmstadt
Eosin-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
FACSClean	BD Heidelberg
FACSflow	BD Heidelberg
FACSRinse	BD Heidelberg
Fix/Perm	eBiosciences, Frankfurt
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching
Hämatoxylin-Lösung	Merck, Darmstadt
HCL (1 N)	Roth, Karlsruhe
Heparin-Natrium	Ratiopharm
HEPES-Puffer (1 M)	PAN, Aidenbach
Ionomycin	Alexis, Lausen Schweiz
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim

L-Glutamin (Lsg., 200 mM)	PAA, Pasching
Luziferin	Biosynth, Staad Schweiz
NaOH (1N)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Pyruvat (100 mM)	PAN, Aidenbach
MEM NEAA	PAN, Aidenbach
PBS (ohne Ca/Mg)	PAA, Pasching
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco, Invitrogen, Auckland
Permeabilisierungspuffer (10x)	eBioscience, Frankfurt
PMA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid (PI)	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim
Szintillationsflüssigkeit (Microsint-20)	PerkinElmer, Rodgau
Trypanblau (0,4%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	PAN, Aidenbach
Türks-Lösung	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis

2.1.2 Antikörper

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugat	Hersteller
CD3	IgG1	145-2C11	Hamster	Purified	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD3	IgG1	145-2C11	Hamster	FITC	eBiosciences, Frankfurt
CD4	IgG2a	RM4-5	Ratte (DA)	FITC, PE, APC, Pacific Blue	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD8a	IgG2a	53-6.7	Ratte (Lew)	PE, PerCP, APC, PE-Cy7	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD11b	IgG2b	M1/70	Ratte	FITC, PE-Cy7	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD16/CD32	IgG2a	93	Ratte	Purified	BioLegend/Biozol, Eching
CD19	IgG2a	1D3	Ratte (Lew)	FITC, PE-Cy7	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD19	IgG2a	6D5	Ratte	PE	BioLegend/Biozol, Eching
CD25	IgG1	PC61	Ratte	PE, APC, PE-Cy7	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD28	IgG2	37.51	Hamster	Purified	Pharmingen/BD, Heidelberg

CD45.1	IgG2a	A20	Maus	PE, APC	BioLegend/Biozol, Eching
CD45R/B220	IgG2a	RA3-6B2	Ratte	FITC	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD49b	IgM	DX5	Ratte	APC	BioLegend/Biozol, Eching
CD62L	IgG2a	MEL-14	Ratte	FITC, APC	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD90.1	IgG1	OX-7	Maus (BALB/c)	PerCP	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD90.1	IgG2a	H1S51	Maus	PE-Cy7	eBiosciences, Frankfurt
CD134 (OX-40)	IgG1	OX-86	Ratte	Biotin	BioLegend/Biozol, Eching
CD137 (4-1BB)	IgG	17B5	Hamster	Biotin	BioLegend/Biozol, Eching
CDw137L (4-1BBL)	IgG2a	TKS-1	Ratte	Biotin	BioLegend/Biozol, Eching
CD152 (CTLA-4)	IgG1	UC10-4F10-11	Hamster	PE	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD252 (OX-40L)	Ig2b	RM134L	Ratte	Biotin	Pharmingen/BD, Heidelberg
FoxP3	IgG2a	FJK-16s	Ratte	FITC, PE	eBiosciences, Frankfurt
Gr-1	IgG2b	RB6-8C5	Ratte	APC	eBiosciences, Frankfurt
H2Kb	IgG2a	AF6-88.5	Maus (BALB/c)	FITC, PE	BioLegend/Biozol, Eching
H2Kd	IgG2a	SF1-1.1	Maus (SJL)	FITC, PE	BioLegend/Biozol, Eching
I-Ab	IgG2a	AF6-120.1	Maus (BALB/c)	PE	Pharmingen/BD, Heidelberg
I-Ad	IgG2b	AMS-32.1	Maus (SJL)	PE	Pharmingen/BD, Heidelberg
IFN- γ	IgG1	XMG1.2	Ratte	APC	Pharmingen/BD, Heidelberg
IL-2	IgG2b	JES6-5H4	Ratte	APC	Pharmingen/BD, Heidelberg
IL-10	IgG2b	JES5-16E3	Ratte	APC	Pharmingen/BD, Heidelberg
TCR β	IgG2b	H57-597	Hamster	PE, APC	Pharmingen/BD, Heidelberg
TNF- α	IgG1	MP6-XT22	Ratte	APC	Pharmingen/BD, Heidelberg

2.1.3 Beads

Name	Hersteller
Anti-PE MicroBeads	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
CD4 (L3T4) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
CD8a (Ly-2) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
CD90.2 (Thy1.2) MicroBeads, mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96-well-Rundbodenplatten	Corning/Costar, NY USA
5 ml FACS-Röhrchen steril	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ USA
5 ml FACS-Röhrchen unsteril	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ USA
Zentrifugationsröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ USA
Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning/Costar, NY USA
Deckgläser (20 x 26 mm, 24 x 40 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Einwegskalpell	Feather
Filterplatte (Unifilter)	Packard, Niederlande
Gewebeschwamm	Labonord, Mönchengladbach
Kanülen (0,4; 0,9 mm)	BD, Heidelberg
Klebefolie	Packard, Niederlande
MACS-Separation Columns (LS, LD)	Miltenyi Biotech,
MACS-Separation Siebe	Miltenyi Biotech,
Petrischalen (100 x 15 mm)	Falcon/BD, Franklin Lakes, NJ USA
Spritzen (1 ml, 10 ml)	BD, Heidelberg
Zellsiebe (70 µm)	Falcon/BD, Heidelberg

2.1.5 Geräte

Geräte	Hersteller
Absaugpumpe	KNF Lab, Freiburg
ARIA Hochgeschwindigkeitszellsorter	BD, Heidelberg
BD™ LSR II Durchflußzytometer	BD, Heidelberg
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
IVIS® Imaging System	Xenogen, Alameda/USA
MACS® Multistand	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Megafugen Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Midi-MACS™ (Magnet)	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
Mikroskop	Leitz, Wetzlar
Mikrotom Frigucot 2800-E	Reichert Jung, Wetzlar
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Szintillationszähler (TopCount)	Packard, Niederlande
Tischzentrifuge	Heraeus, Hanau
UniFilter	Packard, Niederlande

2.1.6 Versuchstiere

Mausstamm	Herkunft
BALB/c	Charles River, Sulzbach
BALB/c Thy1.1	Eigene Zucht, Ursprung: Mainz (U. Sahin)
C57BL/6	Charles River, Sulzbach
C57BL/6 Ly5.1	Eigene Zucht, Ursprung: Erlangen (T. Winkler)
CB6F1 (BALB/c x C57BL/6)	Charles River, Sulzbach
DBA/1J	Elevantage Janvier
DBA/2	Charles River, Sulzbach
FVB/N	Charles River, Sulzbach
FVB/N luc	Eigene Zucht, Ursprung: Freiburg (R. Zeiser)

2.1.7 Medien, Puffer und Lösungen

RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin): Lonza, Verviers/Belgien

5% RPMI-Medium:

RPMI 1640 Medium
5% FCS
100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin

10% RPMI-Medium:

RPMI 1640 Medium
10% FCS
100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin

Standardmedium:

RPMI 1640 Medium mit folgenden Zusätzen:
2 mM L-Glutamin; 50 µM 2-Mercaptoethanol; 1 mM Natrium-Pyruvate; 1% NEAA;
100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin; 10 % FCS; 10 mM HEPES-Puffer

MACS-Puffer (entgast):

PBS
2mM EDTA
1% FCS

FACS-Puffer:

PBS
2% FCS

ACK-Puffer (6x):

0,155M NH₄CL
0,1M KHCO₃
0,1mM EDTA-Di-Natriumsalz

2.2 Methoden

2.2.1 Ermittlung der Lebendzellzahl

Zur Ermittlung der Lebendzellzahl werden Zellen in einer 0,15% Trypanblau-Lösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Mikroskop (10-facher Vergrößerung) ausgezählt. Diese Methode unterscheidet zwischen lebenden und toten Zellen, da nur abgestorbene Zellen aufgrund fehlender Membranintegrität den Farbstoff aufnehmen. Enthält die Zellsuspension noch Erythrozyten wird eine Türks-Lösung verwendet, dessen enthaltene Essigsäure die Erythrozyten hämolysiert und Leukozyten durch den Farbstoff anfärbt.

Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadranten}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

2.2.2 Zellfärbung für durchflußzytometrische Analysen

Alle Inkubationen werden auf Eis und aufgrund der fluoreszenzmarkierten Antikörper unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung durchgeführt.

2.2.2.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

Die zu analysierenden Zellen (in der Regel 1×10^6 Zellen/Färbung) werden in ein FACS-Röhrchen überführt, mit FACS-Puffer aufgefüllt und abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert (1×10^6 Zellen/100 µl). Um unspezifische Bindungen über die Fc-Rezeptoren zu minimieren, werden die Mauszellen vorab mit blockierendem anti-CD16/CD32 Antikörper ($1 \mu\text{g}/1 \times 10^6$ Zellen pro 100 µl) für 5-10 min bei 4 °C inkubiert. Als nächstes wird die vom Hersteller angegebene Menge Antikörper auf die Zellsuspension pipettiert und 20 min bei 4 °C gefärbt. Nach erneutem Waschen mit FACS-Puffer wird das Pellet in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Zentrifugationsschritte erfolgen bei 300 g (4 °C, 5-10 min). Die Proben wurden kurz vor der

Messung mit DAPI (1ng/ml) versehen, um eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen zu ermöglichen.

2.2.2.2 Färbung intrazellulärer Moleküle

Für die gleichzeitige Analyse von extra- und intrazellulären Molekülen werden die Zellen zuerst mit Oberflächenmolekülen gefärbt (siehe 2.2.2.1) und anschließend mit 250 µl Cytofix/Cytoperm (BD) für 20 min bei 4 °C fixiert und permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen mit BD Perm/Wash, welcher die Zellen in einem permeabilisierten Zustand hält, werden die Zellen mit Antikörpern für Intrazellulärfärbung für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit BD Perm/Wash werden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Zentrifugationsschritte erfolgen bei 300 g (4 °C, 5-10 min).

2.2.2.3 FoxP3 Färbung

Nach Anfärbung der Oberflächenmoleküle (Abschnitt 2.2.2.1) werden die Zellen in 1 ml Fixierungs/Permeabilisierungslösung (eBioscience) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach werden die Zellen zweimal mit 2 ml Permeabilisierungspuffer (eBioscience) gewaschen, optional mit blockierendem anti-CD16/CD32 Antikörper (1 µg/ 1 x 10⁶ Zellen pro 100 µl) für 5-10 min bei 4 °C inkubiert, und für 30 min bei 4 °C mit anti-FoxP3 Antikörper (1 µg/ 1 x 10⁶ Zellen) gefärbt. Nach einem erneuten Waschschriff mit 2 ml Permeabilisierungspuffer, werden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Zentrifugationsschritte erfolgen bei 300 g (4 °C, 5-10 min).

2.2.2.4 PMA/Ionomycin Stimulation für Zytokinanalysen

Für die durchflußzytometrische Analyse der Zytokinexpression werden die zu untersuchenden Zellen vorab mit PMA/Ionomycin stimuliert. Die Zellen werden in Standardmedium mit 20 ng/ml PMA und 1 µM Ionomycin in Gegenwart von Monensin (Golgi Stop, BD) für 4 bis 5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer werden die Zellen erst für ihre Oberflächenmarker und anschließend intrazellulär gefärbt. Zur

Untersuchung der Zytokinsekretion in Kombination mit der FoxP3 Expression werden die Zellen intrazellulär nach dem FoxP3 Färbeprotokoll (2.2.2.3) gefärbt.

2.2.2.5 Durchflußzytometrische Messungen

Die Durchflußzytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting) dient der Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen. Dabei werden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und in einer Trägerflüssigkeit an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Im verwendeten Gerät (LSR II) stehen vier luftgekühlte Laser (488 nm, 409 nm, 633 nm und UV Laser) für die Anregung der Farbstoffe zur Verfügung. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben und fallen unter Abgabe von Energie (Photonen) wieder auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge an gebundenem Antikörper pro Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Größe („Vorwärts-Streulicht“ FSC) und Granularität („Seitwärts-Streulicht“ SSC) der Zellen gewonnen. Als Fluorochrome werden FITC, PE, PerCP, APC, PacificBlue und PE-Cy7, sowie der DNA Farbstoff DAPI verwendet. Somit werden insgesamt für jede Zelle bis zu 8 Parameter ermittelt. Da sich die Wellenlängenbereiche (**Tab. 2.1**) teilweise überlappen, muss über optische Interferenzfilter eine Kompensation erfolgen. Hierbei wird der Anteil des Fluoreszenzsignals eines Farbstoffes, der in einen anderen Kanal strahlt, abgezogen.

Beispiel: FITC (FL1-Kanal) gegen PE (FL2-Kanal)

$$\text{FL-1} = \text{FL-1} - x\% \text{FL-2} \quad \text{und} \quad \text{FL-2} = \text{FL-2} - x\% \text{FL-1}$$

Für die Aufnahme der Zellen wird die BD FACS DIVA Software verwendet. Die Auswertung erfolgt mit dem Analyseprogramm „FlowJo“ (Treestar).

Fluorochrom	Laser Anregung (nm)	Absorptionsmaxima (nm)	Emmissionsmaxima (nm)
FITC	488	490	525
PE	488	490; 565	578
PerCP	488	490	675
PE-Cy7	488	496; 546	785
Pacific Blue	409	416	455
APC	633	650	661

Tab. 2.1: Wellenlängenbereiche eingesetzter Farbstoffe.

2.2.3 Isolierung der verwendeten Zellpopulationen

2.2.3.1 Gewinnung von murinen Milzzellen

Die Maus wird euthanasiert, die Milz aseptisch entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in 5% RPMI-Medium auf Eis gelagert. Unter sterilen Bedingungen wird die Milz in eine Petrischale überführt und vom restlichen Bindegewebe befreit. Danach wird sie in eine vorgekühlte Petrischale mit etwa 10 ml 5% RPMI-Medium gegeben und mit einer gebogenen Pinzette ausgestrichen. Die Zellsuspension wird mit einer 5 ml Pipette gut resuspendiert (Petrischale schräg halten und Zellen über die gesamte Fläche laufen lassen). Anschließend werden die Zellen über ein 70 µm Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen filtriert. Dabei werden maximal 3 Milzen in 1 Röhrchen gegeben. Die Petrischale wird zweimal mit 5 ml 5% RPMI-Medium gespült und die Lösung ebenfalls über das Zellsieb pipettiert. Nach Auffüllen des Röhrchens mit 5% RPMI-Medium werden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet in 2 ml 10% RPMI-Medium resuspendiert. Zur Erythrozytenlyse werden 3 ml ACK-Puffer (1x) zugegeben und 3 min bei RT inkubiert (bei 2-3 Milzen: 4 ml 10% RPMI-Medium und 6 ml ACK-Puffer). Nach zwei weiteren Waschschritten werden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und mit 0,15% Trypanblau die Zellzahl bestimmt. Alle Zentrifugationsschritte werden bei 300g und 4 °C für 10 min durchgeführt.

2.2.3.2 Isolierung einzelner Zellpopulationen aus murinen Milzzellen mittels magnetischer und durchflußzytometrischer Zellseparation

Für die Anreicherung einzelner Zellpopulationen wird das magnetische System von Miltenyi Biotec gewählt. Diese Methode beruht auf der Bindung von Zellen an Antikörper-beschichtete Eisenpartikel (Microbeads) und der anschließenden Trennung markierter Zellen von nicht-markierten Zellen im magnetischen Feld. Hierfür wird die Zellsuspension über eine Säule gegeben, die sich in einem magnetischen Feld befindet. Das Eluat dieser Säule enthält die nicht-markierten Zellen. Eluiert man dann die Säule außerhalb des Magnetfeldes erhält man die magnetisch markierten Zellen.

Die Methode kann sowohl zur positiven Anreicherung einer gewünschten Population, als auch zur Depletion unerwünschter Populationen eingesetzt werden.

Isolierung von CD4⁺CD25⁺ nTreg-Zellen:

Für eine erste Anreicherung von CD4⁺CD25⁺ nTreg-Zellen werden Gesamtmilzzellen mit PE anti-CD25 angefärbt (0,1 µg/100 µl/10 x 10⁶ Zellen; normalerweise: 0,2 µg/100 µl/1x10⁶ Zellen). Anschließend wird das Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert und mit anti-PE Microbeads inkubiert. Als nächstes werden die Zellen über einen 70 µm Zellsieb filtriert, mit MACS-Puffer gewaschen und anschließend in MACS-Puffer aufgenommen. Für die Aufreinigung wird eine LS-Separationssäule verwendet, die in einen Permanentmagneten eingespannt wird. Vor dem Säulenlauf wird die Säule mit MACS-Puffer äquilibriert (1 x 3 ml). nTreg-Zellen befinden sich in der CD25⁺ Fraktion und werden somit an den Magneten gebunden. Nicht-gebundene Zellen (= CD25⁻ Fraktion), können für weitere Anreicherungsschritte verwendet werden. Die Zellen der CD25⁺ Fraktion werden anschließend mit anti-CD4 Antikörper eines beliebigen Konjugats (außer PE) gefärbt und mittels eines FACS-ARIA Zellsortierers durchflußzytometrisch in hoher Reinheit isoliert.

Isolierung von CD4⁺ und CD8⁺ Tresp-Zellen:

Die Anreicherung von CD4⁺ und CD8⁺ Tresp-Zellen erfolgt entweder aus Gesamtmilzzellen oder der CD25⁻ Fraktion. Dazu werden die Zellen in einem ersten Schritt mit CD4 und CD8 Microbeads über eine LS-Separationssäule positiv angereichert. Anschließend werden sie mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 (und ggf. CD25) markiert und zusätzlich für *in vitro* Analysen mittels eines FACS-ARIA Zellsortierers durchflußzytometrisch isoliert.

Isolierung von APCs:

Als APCs werden CD90-depletierte Milzzellen verwendet, die aus Gesamtmilzzellen oder der CD25^{neg} Fraktion gewonnen werden. Hierbei handelt es sich bei den nicht-markierten Zellen um die Zielzellen. Die Isolation der APCs erfolgt mittels LD-Depletionssäule.

Die Menge an Beads, Puffer-Lösungen und Inkubationszeiten sind in **Tab. 2.2** zusammengestellt.

	Puffer	Isolation von Treg-Zellen	Isolation von Tresp-Zellen	Selektion von APC
Zellpopulationen		CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD4 ⁺ , CD8 ⁺	CD90 ⁻
Isolation aus		Gesamtmilz	Gesamtmilz; negativ Fraktion	Gesamtmilz; negativ Fraktion
Färbeschritt	FACS-Puffer	PE anti-CD25 0,1 µg/100 µl/10 x10 ⁶ Zellen	-	-
Beads	FACS-Puffer	anti-PE Beads	CD4 Beads, CD8 Beads	CD90.2 Beads
Menge pro 10 x10⁶ Zellen		90 µl FACS-Puffer 10 µl Beads	90 µl FACS-Puffer 10 µl Beads	90 µl FACS-Puffer 10 µl Beads
Inkubation 4 °C		15'	15'	15'
Säulen		LS	LS	LD
Säule äquilibrieren	MACS-Puffer	3 ml	3 ml	2 ml
negativ Fraktion Eluieren	MACS-Puffer	3 x 3 ml	3 x 3 ml	2 x 1ml
positiv Fraktion Eluieren	MACS-Puffer	5 ml	5 ml	-

Tab. 2.2: Protokoll für die Anreicherung einzelner Zellpopulationen mittels magnetischer Zellseparation.

2.2.3.3 Gewinnung von murinen Knochenmarkzellen

Femur und Tibia der Maus werden aseptisch präpariert und das restliche Muskelfleisch mit einem Einwegskalpell vollständig abgeschabt. Unter sterilen Bedingungen werden die Enden der Knochen mit einer Schere geöffnet und in eine vorgekühlte Petrischale mit 5% RPMI-Medium überführt. Mit einer 10 ml Spritze, einer 0,4 mm Kanüle und 5% RPMI-Medium werden die freigelegten Knochenmarkkanäle durchgespült. Das herausgedrückte Knochenmark wird mit einer 5 ml Pipette gut resuspendiert und über ein 70 µm Filtersieb in ein 50 ml Falcon Tube filtriert (max. 3 Mäuse pro Tube). Die Petrischale wird zweimal mit 10 ml 5% RPMI-Medium gespült und die Lösung ebenfalls über das Zellsieb pipettiert. Nach einem Waschschrift mit 5% RPMI-Medium wird das Pellet in 2 ml 5% RPMI-Medium resuspendiert und nach Zugabe von 3 ml ACK-Puffer (1x) für 1 min bei RT inkubiert. Danach wird die Zellsuspension mit 10% RPMI-Medium gewaschen und das Knochenmark in FACS-Puffer aufgenommen. Zur Zellzahlbestimmung werden die Zellen mit 0,15% Trypanblau verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Alle Zentrifugationsschritte werden bei 300g und 4 °C für 10 min durchgeführt.

2.2.3.4 T-Zelldepletion von murinen Knochenmarkzellen

Für die T-Zelldepletion von murinen Knochenmarkzellen wird das magnetische System von Miltenyi Biotec verwendet. Dazu werden die Knochenmarkzellen in FACS-Puffer (90 µl pro 10×10^6 Zellen) aufgenommen und mit CD90.2 Microbeads (10 µl pro 10×10^6 Zellen) für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Zellen über ein 70 µm Sieb filtriert, mit MACS-Puffer gewaschen und in MACS-Puffer resuspendiert. Für die T-Zelldepletion wird eine LS-Separationssäule verwendet, die in einen Permanentmagneten eingespannt und vorab mit MACS-Puffer äquilibriert wird. Die Zellsuspension wird über die Säule gegeben und anschließend 3 x mit 3 ml MACS-Puffer gespült. Die T-Zell-depletierten Knochenmarkzellen befinden sich im Eluat. Zur Zellzahlbestimmung werden die Zellen mit 0,15% Trypanblau verdünnt und gezählt. Anschließend wird die Zellsuspension mit 10% RPMI-Medium gewaschen, in 5% RPMI-Medium aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Alle Zentrifugationsschritte werden bei 300g und 4 °C für 10 min durchgeführt.

2.2.4 Untersuchungen *In vitro*

2.2.4.1 Proliferationsmessung mittels ^3H -Thymidin-Einbau

Die nTreg-vermittelte Suppression der Proliferation von $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ bzw. $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen wird mittels ^3H -Thymidin-Suppressionstest untersucht. Hierbei wird am Vortag des Test-Endes ^3H -Thymidin im Überschuss in die MLR steril zugegeben. Somit ist die zelluläre Eigenproduktion vermindert und das markierte Molekül wird in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Die ^3H -Thymidin-Stammlösung (37 MBq) wird 1:4 verdünnt und mit Standardmedium 20 µl/well eingesetzt. Nach 18 Stunden werden die 96-well-Rundbodenplatten mittels eines Absauggerätes auf eine Filterplatte abgeerntet. Nach dem Trocknen der Platte wird die Filterplatte auf dem Boden mit einer Klebefolie abgedichtet und mit 50 µl/well Szintillationsflüssigkeit pro well betropft. Die Filterplatte wird mit einer Klebefolie auf der Oberseite versiegelt und die Radioaktivität („Ereignisse pro Minute“, cpm) der Einzelwells im Szintillationszähler ermittelt.

2.2.4.2 Proliferationsmessung mittels CFSE-Markierung

CFSE-Markierung:

Zur Analyse der Proliferation von T-Lymphozyten wird der Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) verwendet. CFSE diffundiert durch die Zellmembran und bindet unter Abspaltung der Succinimidylgruppe an Lysin- und Argininreste cytoplasmatischer Proteine. Bei Teilung der Zelle wird der Farbstoff zu gleichen Teilen an die beiden Tochterzellen weitergegeben. Die Anzahl der Zellteilungen lässt sich somit anhand der abnehmenden Fluoreszenzintensität einer Zelle bestimmen. Zu analysierende T-Zellen werden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wird das Pellet in PBS (500 μ l/10 x 10⁶ Zellen) resuspendiert, das gleiche Volumen einer CFSE-Lösung (2 μ M) zugegeben und im Dunkeln für 3 min bei RT inkubiert. Die gefärbten Zellen werden danach einmal mit PBS+10% FCS und einmal mit Standardmedium gewaschen. Um einen möglichen Verlust von Zellen zu detektieren, wird zuletzt die Zellzahl mit 0,15% Trypanblau bestimmt.

Proliferationsmessung von CFSE-markierten Zellen:

Die nTreg-vermittelte Inhibition der Proliferation von Tresp-Zellen kann mittels CFSE-Markierung untersucht werden. Dazu werden CD4⁺CD25⁻ bzw. CD4⁺/CD8⁺CD25⁻ Tresp-Zellen mit 1 μ M CFSE gefärbt und in unterschiedliche Suppressionsexperimente eingesetzt. Nach Inkubation der verschiedenen Kokulturen werden die Zellen geerntet und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. CFSE wird nach Anregung mit Licht (488 nm) bei 517 nm emittiert, weshalb für zusätzliche Antikörperfärbungen der Fluoreszenzkanal 1 vermieden wird. Da der Fluoreszenzfarbstoff bei Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wird, können sowohl proliferierende Zellen, als auch supprimierte Zellen untersucht werden. Die Wellenlängenbereiche von CFSE und den eingesetzten Fluorochromen überlappen sich teilweise, weswegen vor jeder FACS-Zellanalyse eine Kompensation durchgeführt wird.

2.2.4.3 Suppressionsexperiment nach polyklonaler Stimulation

Frisch isolierte CD4⁺CD25⁻ Tresp-Zellen werden mit CFSE gefärbt und mit CD4⁺CD25⁺ nTreg-Zellen im Verhältnis 1:1 in Standardmedium inkubiert. Für die polyklonale Stimulation der einzelnen T-Zellsubpopulationen werden autologe APCs und eine bestimmte Konzentration (von 500 ng bis 5 ng) an anti-CD3 Antikörper zugegeben. In den Versuchen werden 50.000 CD4⁺CD25⁻ und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen/well zusammen mit 100.000 APCs/well

in 200 µl Standardmedium eingesetzt. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation werden die Zellen geerntet und mit unterschiedlichen Antikörpern gefärbt. Als Kontrollen dienen Ansätze in denen Tresp-Zellen ohne nTreg-Zellen stimuliert werden.

2.2.4.4 Suppressionsexperiment im allogenen Stimulationsmodell („mixed lymphocyte reaction“ MLR)

Hochaufgereinigte CD4⁺CD25⁻ bzw. CD4⁺/CD8⁺ (im Verhältnis 2:1) Tresp-Zellen werden mit CD4⁺CD25⁺ nTreg-Zellen im Verhältnis 1:1 kokultiviert und mit allogenen APCs in 200 µl Standardmedium 6 bis 7 Tage stimuliert. Die APCs werden, um ihr eigenes Wachstum zu verhindern, zuvor mit 30 Gy bestrahlt. In den Ansätzen werden 100.000 CD4⁺CD25⁻ bzw. CD4⁺/CD8⁺ (2:1) Tresp-Zellen und 100.000 nTreg-Zellen mit 100.000 bis 300.000 APCs pro well eingesetzt. Als Kontrollen werden Tresp-Zellen alleine oder mit bestrahlten CD4⁺CD25⁻ Tresp-Zellen inkubiert. Die Suppression der Proliferation von Tresp-Zellen wird mittels ³H-Thymidin-Einbau oder CFSE-Ausverdünnung untersucht.

2.2.5 Untersuchungen *in vivo*

2.2.5.1 Konditionierung der Mäuse und Transplantation von Knochenmark und Milzzellen

Die Mäuse werden in Abhängigkeit vom Stamm mit 1 x 900 cGy (BALB/c), oder mit 2 x 600 cGy (DBA/1) bzw. 2 x 650 cGy (CB6F1) im Abstand von 3-4 Stunden bestrahlt. Die Transplantation der Zellen erfolgt innerhalb von 24 Stunden nach der letzten Bestrahlung. Unmittelbar vor der Injektion werden die entsprechenden Mengen an T-Zellen und T-Zelldepletiertem Knochenmark in einem Volumen von 300 µl pro Maus, in 5% RPMI-Medium, vereinigt. Die Injektion erfolgt intravenös in die Schwanzvene der Maus.

2.2.5.2 Bewertung der GvHD

Für die Beurteilung des Gesundheitszustandes von transplantierten Mäusen wurde zweimal wöchentlich ein etabliertes Bewertungsschema (unten angegebene Tabelle) nach Cooke et

al. (1996) verwendet. Dabei werden das Fell, die Haut, die Körperhaltung, Mobilität und das Gewicht der Mäuse berücksichtigt. Mit einer Skala von 0-2 pro Kriterium erhält man einen maximalen Wert von 10. Nach den an der Universität Regensburg geltenden Richtlinien für einen angemessenen Umgang mit Tieren im Versuch, müssen Mäuse bei einem Wert von ≥ 6 euthanasiert werden. Dieser Tag wird in der Überlebenskurve als Todestag dokumentiert.

	Haut	Fell	Körperhaltung	Aktivität	Gewicht
0.5	Schuppung an Pfote und Ohren	struppiges Fell ventral	leichte Kyphose, nur in Ruhe	Aktivität reduziert	-
1	Erythem an Schwanz und Anus	ventrale Querlinien, leicht struppiges Fell dorsal	leichte Kyphose auch bei Bewegung	>50% des Beobachtungszeitraums keine Bewegung	10-25% Gewichtsverlust
1.5	offene Läsion	Struppiges Fell >50% der Oberfläche	Kyphose	Bewegung nur nach Stimulation	-
2	multiple offene Läsionen	Gesamtes Fell betroffen, Fellverlust	starke Kyphose, eingeschränkte Beweglichkeit	keine Bewegung, auch nach Stimulation	>25% Gewichtsverlust

Tab. 2.3: Bewertung der klinischen GvHD nach Cooke et al., 1996.

2.2.6 *In vivo* Biolumineszenz Imaging

Für den Nachweis der Expansion und Migration von Effektorzellen in lebenden Mäusen wird das Verfahren des *in vivo* Biolumineszenz Imagings (BLI) verwendet.

Die Methode beruht auf einem Prozess, bei dem emittiertes Licht von einer sensitiven, signalverstärkten „charge couple device“ (CCD) Kamera gemessen wird. Das emittierte Licht wird von dem biolumineszierenden Enzym der Firefly-Luziferase abgesondert. Hierbei decarboxyliert die Luziferase unter Verbrauch von Sauerstoff und ATP das extern zugegebene Luziferin zu Oxyluziferin, welches dadurch in einen elektronisch angeregten Zustand gelangt. Bei Rückkehr des angeregten Oxyluziferins in seinen Ausgangszustand wird Licht emittiert (562 nm), die Effizienz liegt hierbei nahe ein Photon pro umgesetzten Molekül Oxyluciferin. Die Photonen können dabei biologisches Gewebe durchdringen und außerhalb des Körpers von einer CCD Kamera gemessen werden. Dadurch ist mit dieser Methode ein sensitives Nachweisverfahren von Zellen im lebenden Tier möglich. Um die

frühe Expansion von T-Zellen zu untersuchen, werden diese aus transgenen Mäusen isoliert, die das Reporter-Gen für Luziferase in allen hämatopoetischen Zellen exprimieren.

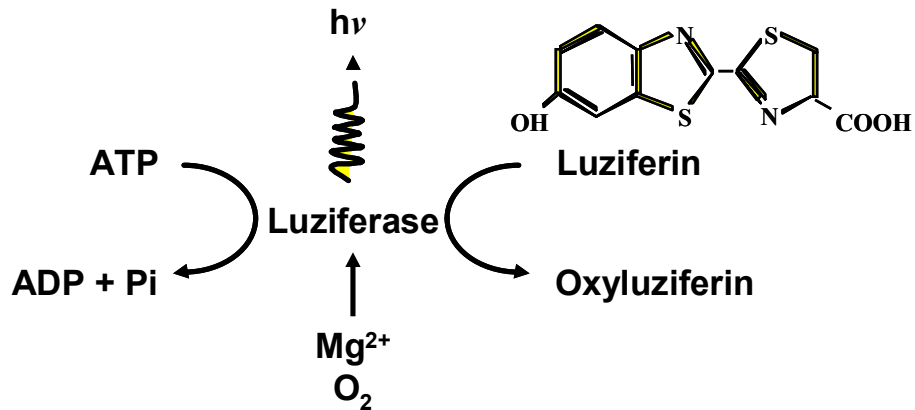


Abb. 2.1: Chemische Reaktion von Luziferase.

Die Mäuse werden zunächst mit Isofluran (5%) narkotisiert, anschließend wird das Substrat Luziferin (150 mg/kg) intraperitoneal injiziert. Das Tier wird in einer lichtdichten Kammer gelagert und die emittierten Photonen werden mit einer CCD Kamera (IVIS® Imaging System 100) gemessen. Die emittierte Lichtintensität wird farblich codiert und auf ein zuvor aufgenommenes Schwarz-Weiß-Bild des zu untersuchenden Tiers projiziert. Die Belichtungszeit beträgt 10 min. Für die Berechnung der Abgabe von Photonen/Zeit pro Maus wurde die IVIS Living Image Software verwendet.

2.2.7 Histologie

2.2.7.1 Einbettung von Organen und Gewebeschnitte

Zur Herstellung von Gewebeschnitten werden die Organe in Paraffin eingebettet. Hierfür werden die entnommenen Organe zunächst von Blut und überschüssigem Bindegewebe befreit und auf einem Gewebeschwamm in eine Einbettkassette gelegt. Diese werden danach für etwa 24 h in Formaldehyd (< 5%) gelagert. Nach Entwässerung der Organe (erfolgte durch Mitarbeiter des Instituts für Pathologie), werden diese in Plastikkassetten eingebettet und in heißem Paraffin eingegossen.

Die eingebetteten Organe werden vor dem Schneiden 24 h bei 4 °C gekühlt, anschließend am Mikrotom 5 µm dick geschnitten und auf Objektträger gezogen. Bis zur weiteren Verarbeitung werden die Schnitte bei RT gelagert.

2.2.7.2 Hämatoxylin/Eosin Färbung

Die Paraffinschnitte werden zuerst zweimal für 5 min in Xylol und anschließend in absteigender Ethanolreihe (100%, 96%, 70%) für jeweils 2 min rehydriert. Danach werden die Schnitte 1-3 min mit Hämatoxylin-Lösung gefärbt. Die Schnitte werden 3 min in warmem und anschließend kaltem Leitungswasser gebläut und 20 sec in Eosin-Lösung (mit einigen Tropfen Essigsäure) erneut gefärbt. Danach werden die Schnitte in aufsteigender Ethanolreihe (70%, 96%, 100%) bis hin zum Xylol (zweimal 5 min) dehydriert und mit Entellan eingedeckt.

2.2.8 Statistik

Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben. Für die statistischen Analysen der Proliferation von Effektorzellen wurde der Zweistichproben Student's t-Test (Unterschiedliche Varianz) angewendet. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant, ein Wert $p < 0,001$ als statistisch hochsignifikant angesehen.

Zur Analyse der Überlebenskurven von transplantierten Tieren wurde der Kaplan Meier Test (SPSS) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotypisierung und Anreicherung von murinen nTreg-Zellen

Für die Untersuchung der suppressiven Aktivität von nTreg-Zellen gegenüber autologen/MHC-identen und allogenen/MHC-differenten nicht-regulatorischen T-Zellen (Tresp-Zellen) wurden beide T-Zellpopulationen zunächst durchflußzytometrisch charakterisiert. Hierfür wurden murine $CD4^+$ T-Zellen aus der Milz isoliert, mit den Antikörpern anti-CD4 und anti-CD25, und den intrazellulären nTreg-Markern FoxP3 und CTLA-4 gefärbt und anschließend im FACS analysiert.

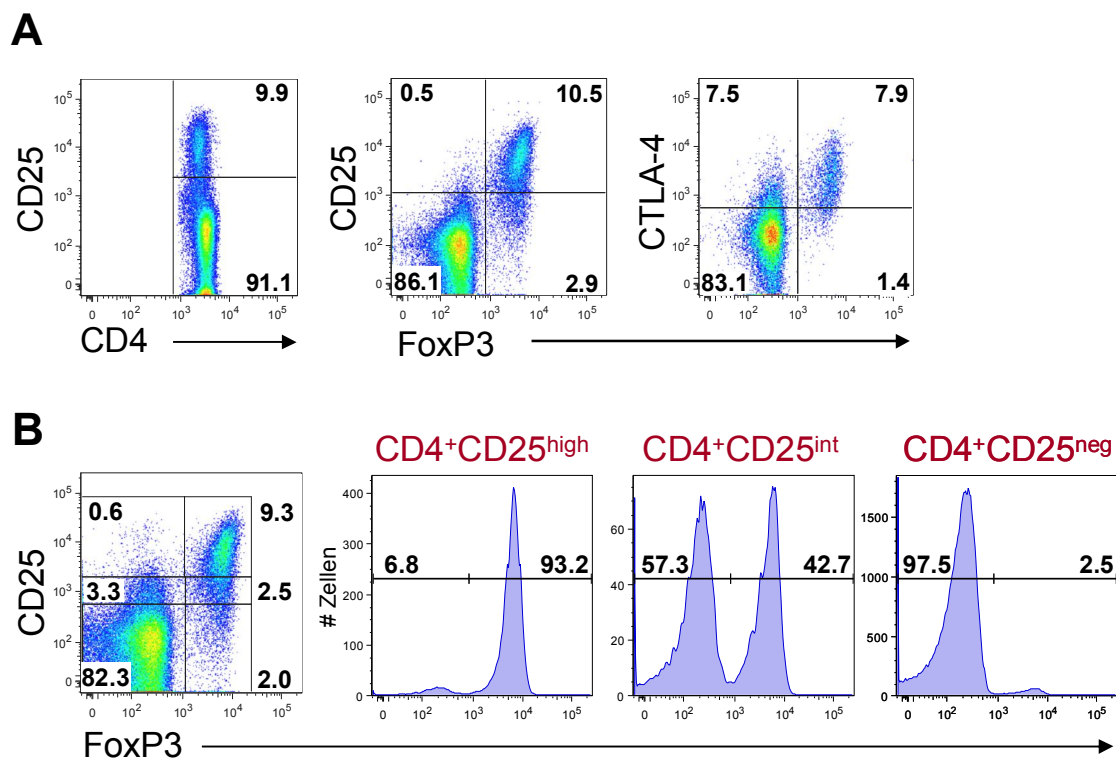


Abb. 3.1: Durchflußzytometrische Analyse von $CD4^+$ Milzzellen. (A) Dargestellt ist die Expression von CD25, FoxP3 und CTLA-4 auf $CD4^+$ T-Zellen der Milz. (B) FoxP3 Expression von $CD4^+CD25^{high}$, $CD4^+CD25^{int}$ und $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen.

Wie in **Abb. 3.1 A** dargestellt, wurden unter den CD4⁺ T-Zellen etwa 10% CD25⁺ Zellen gemessen, die zudem FoxP3 und CTLA-4 konstitutiv exprimieren. Die Expression von FoxP3 und CTLA-4 wird auch auf Tresp-Zellen induziert, jedoch erst nach Aktivierung ihres TCR und dem dadurch induzierten Verlust des naiven Zellphänotyps (46, 89, 164). Infolgedessen wurden diese Moleküle auch kaum von den frisch isolierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen exprimiert.

Abb. 3.1 B zeigt, dass in frisch isolierten CD4⁺ T-Zellen, die hinsichtlich ihrer CD25 Expression in CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{int} und CD4⁺CD25^{neg} T-Zellen unterteilt wurden, nur die CD4⁺CD25^{high} T-Zellen eine Population mit weitgehend (>93%) FoxP3⁺ Zellen darstellt. Dagegen exprimierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen kaum FoxP3 (2,5%), während in 42,7% der CD4⁺CD25^{int} T-Zellen eine FoxP3 Expression nachgewiesen werden konnte.

Die Phänotypisierung von CD4⁺ Milzzellen zeigte, dass nTreg-Zellen in der CD4⁺CD25^{high} Population angereichert sind und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen aus konventionellen T-Helfer-Zellen bestehen. Deshalb konnten beide Subpopulationen aufgrund ihrer CD25 Expression unterschieden und separat isoliert werden. Für Untersuchungen der funktionellen Aktivität von nTreg-Zellen *in vitro* und *in vivo*, wurden beide T-Zellpopulationen zuerst mit Hilfe magnetischer Separation angereichert und anschließend mittels durchflußzytometrischer Zellsortierung isoliert.

Für die Anreicherung von nTreg- und Tresp-Zellen (**Abb. 3.2**) wurden Gesamtmilzzellen zunächst mit anti-CD25-PE Antikörpern angefärbt, danach mit anti-PE Beads inkubiert und anschließend über magnetische Säulen separiert. Beide Fraktionen (CD25⁺ und CD25⁻ Zellen) konnten für die nachfolgenden Aufreinigungsschritte getrennt behandelt werden. Die etwa 3% CD4⁺CD25^{high} T-Zellen der Gesamtmilzpopulation wurden mittels MACS-Separation zu ca. 68% angereichert. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem monoklonalen Antikörper anti-CD4-PacificBlue gefärbt und durchflußzytometrisch sortiert. Die Reinheit nach Zellsortierung von CD4⁺CD25^{high} nTreg-Zellen lag bei >99%. Für die Isolation von konventionellen T-Zellen (zum Einsatz als „Responder-Zellen“ in funktionellen Testsystemen (Tresp-Zellen)) wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen magnetisch mittels Beads aus der CD25⁻ Fraktion angereichert. Dabei wurden die Tresp-Zellen, die sich zu zwei Dritteln aus CD4⁺ und einem Drittel aus CD8⁺ T-Zellen zusammensetzten, zu >94% angereichert. Nach der Oberflächenfärbung mit anti-CD4-PacificBlue, anti-CD8-APC und anti-CD25-PE Antikörper wurden anschließend CD4⁺CD25⁻ und CD8⁺CD25⁻ Tresp-Zellen mittels Zellsortierung isoliert. Die Reinheit der fluoreszenzsortierten Zellen betrug >99%. Exemplarisch ist in Abb. 3.2 die Isolation von CD4⁺CD25⁺ nTreg- und CD4⁺/CD8⁺CD25⁻ Tresp-Zellen einer BALB/c Maus dargestellt.

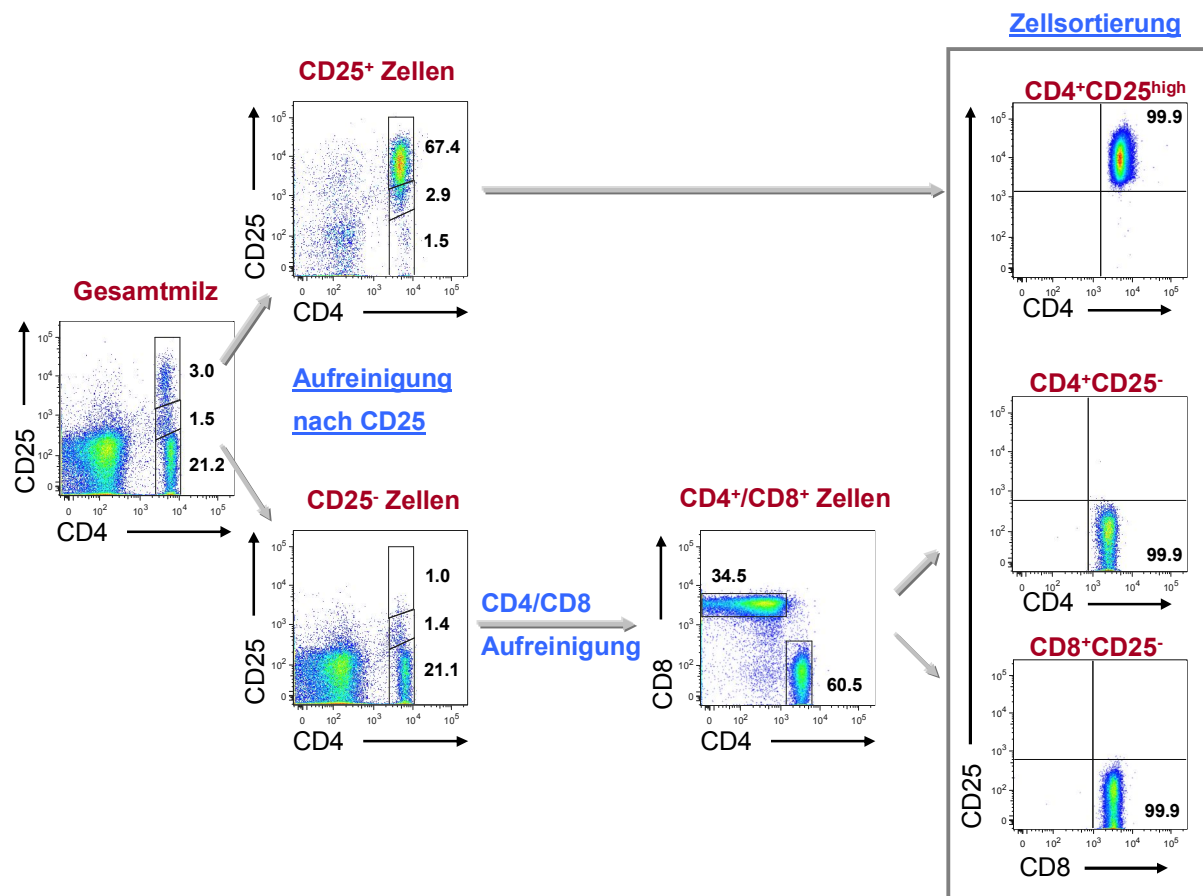


Abb. 3.2: FACS Analysen der einzelnen Anreicherungsfraktionen von CD4⁺CD25⁺ nTreg- und CD4⁺/CD8⁺CD25⁻ Tresp-Zellen. Für die Anreicherung von nTreg- und Tresp-Zellen wurden Gesamtmilzzellen nach der Oberflächenfärbung mit anti-CD25-PE Antikörpern mit anti-PE Beads beladen und anschließend mittels magnetischer Separation in CD25⁺ und CD25⁻ Zellen aufgeteilt. Durch durchflußzytometrische Zellsortierung wurden danach aus diesen Fraktionen die CD4⁺CD25^{high} nTreg- und CD4⁺/CD8⁺CD25⁻ Tresp-Zellen hochrein aufgereinigt. Die Dotplots stellen exemplarisch die Isolation von nTreg- und Tresp-Zellen aus einer BALB/c Maus dar.

3.2 Suppressive Aktivität von nTreg-Zellen *in vitro* nach polyklonaler Stimulation

In früheren tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass nach allogener Knochenmarktransplantation nur nTreg-Zellen des Donorstamms eine Protektion vor GvHD bewirken (161). Darüberhinaus waren nTreg-Zellen nach allogener Stimulation nicht in der Lage, kokultivierte allogene CD4⁺CD25⁻ Tresp-Zellen zu supprimieren. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte deshalb untersucht werden, ob die MHC-Kompatibilität zwischen nTreg-

und Tresp-Zellen eine notwendige Voraussetzung für die suppressive Wirkung von nTreg-Zellen darstellt.

Zunächst wurde in einem Suppressionsexperiment überprüft, ob ein Unterschied in der Inhibition der $CD4^+$ T-Zellproliferation durch autologe und allogene nTreg-Zellen nach polyklonaler Stimulation feststellbar ist. Hierzu wurden BALB/c $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen CFSE gefärbt und mit autologen APCs und 0,5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 Antikörper für drei Tage stimuliert. Zusätzlich wurde ein Teil der Tresp-Zellen entweder mit syngen (BALB/c) nTreg-Zellen (Treg auto) oder allogenen (C57BL/6) nTreg-Zellen (Treg allo) im Verhältnis 1:1 kokultiviert. Wie in **Abb. 3.3** gezeigt, proliferierten innerhalb dieses Zeitraums 82,5% der $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen (rote Profile). In Kokultur mit sowohl autologen als auch allogenen nTreg-Zellen konnte eine Abnahme der Proliferation auf 14% (nTreg auto) bzw. 22% (nTreg allo) gemessen werden (blaue Profile). Die Proliferation von $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen konnte somit durch autologe und allogene nTreg-Zellen gleichermaßen unterdrückt werden.

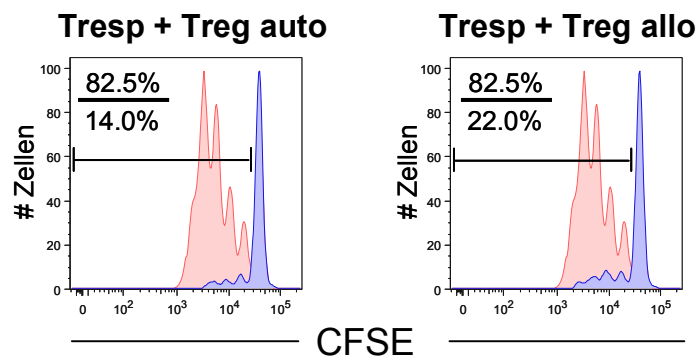


Abb. 3.3: Kokulturrexperimente von frisch isolierten $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen (BALB/c; $H-2^d$) mit autologen und allogenen nTreg-Zellen. Dargestellt ist die Proliferation von Tresp-Zellen nach dreitägiger polyklonaler Stimulation mit autologen APCs und 0,5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD3 Antikörper (rote Profile). Nach Zugabe von autologen (BALB/c, $H-2^d$ = nTreg auto) bzw. allogenen (C57BL/6, $H-2^b$ = nTreg allo) nTreg-Zellen, wurde die Inhibition der Proliferation von Tresp-Zellen durchflußzytometrisch analysiert (blaue Profile). Die Histogramme stellen eines von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten dar.

In unterschiedlichen Studien konnten gezeigt werden, dass sowohl das Ausmaß der suppressiven Wirkung von nTreg-Zellen, als auch die Resistenz der Tresp-Zellen gegen eine solche Suppression von der Stärke der Stimulation abhängig ist. Außerdem ist bekannt, dass nTreg-Zellen eine viel geringere Antigenkonzentration für ihre Aktivierung benötigen als Tresp-Zellen (104, 165). Um die Auswirkungen einer reduzierten Stimulation auf die hier aufgezeigte Suppression näher zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt die Stimulationsstärke herabgesetzt, indem die Konzentration von anti-CD3 von 500 ng/ml auf

bis zu 0,5 ng/ml titriert wurde und CFSE gefärbte $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen (BALB/c; H-2^d) in Gegenwart von autologen APCs damit fünf Tage inkubiert wurden.

Durch die Anwesenheit autologer (BALB/c; H-2^d) bzw. allogener (C57BL/6; H-2^b) nTreg-Zellen wurde die suppressive Funktion beider nTreg-Populationen überprüft. Wie in **Abb. 3.4** dargestellt, konnten $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen mit Konzentrationen zwischen 500 ng/ml und 5 ng/ml anti-CD3 innerhalb von fünf Tagen zur Proliferation gebracht werden (rote Profile; 500 ng/ml: 94,8%; 50 ng/ml: 80,6%; 5 ng/ml: 41,5%). Die Proliferation von $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen nach polyklonaler Stimulation mit 5 ng/ml anti-CD3 Antikörper ähnelte der Proliferation von Tresp-Zellen nach Stimulation mit allogenen APCs (57,9%, siehe Abb. 3.8). Sowohl die Gegenwart von autologen als auch von allogenen nTreg-Zellen führte zu einer signifikanten Inhibition der Proliferation von $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen unter allen getesteten Stimulationsbedingungen.

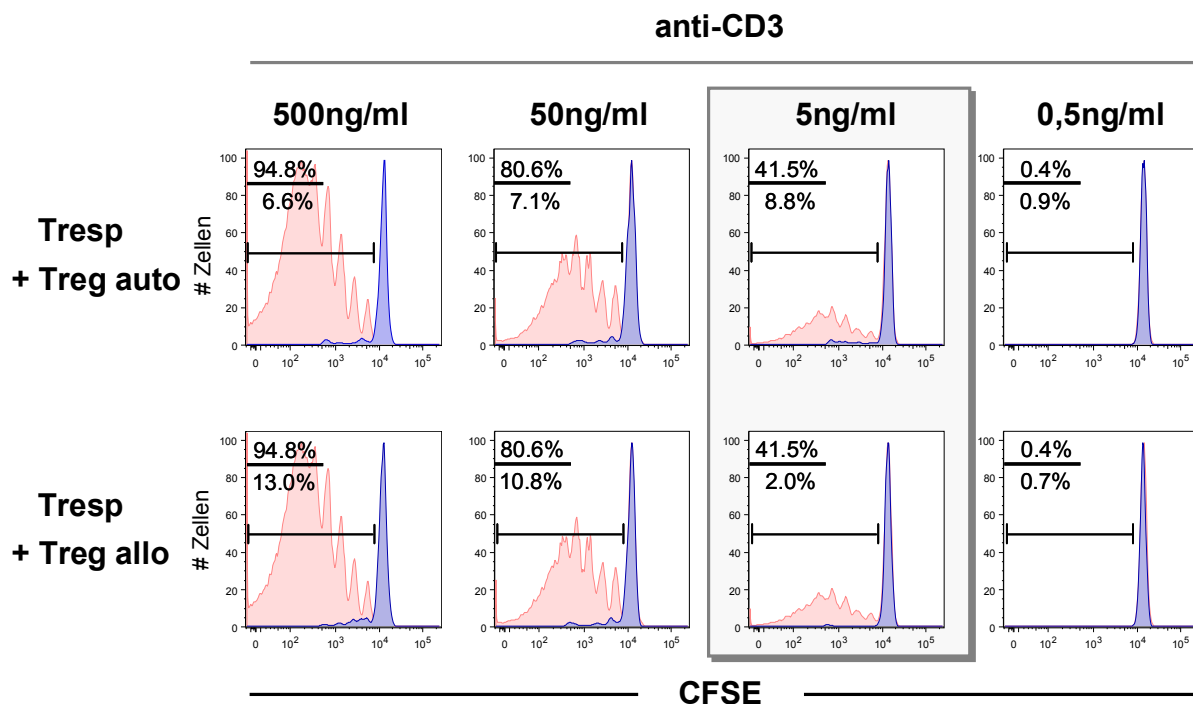


Abb. 3.4: CFSE Expression von $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen in Anwesenheit von autologen bzw. allogenen nTreg-Zellen nach polyklonaler Stimulation mit unterschiedlichen anti-CD3 Konzentrationen. Rote Profile zeigen die Proliferation von CFSE gefärbten BALB/c (CD90.1) $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen (H-2^d) nach fünftägiger Stimulation mit autologen APCs und unterschiedlichen Konzentrationen von anti-CD3. Die Suppression der Proliferation von Tresp-Zellen in Anwesenheit von autologen (BALB/c, CD90.2; H-2^d) bzw. allogenen (C57BL/6, H-2^b) nTreg-Zellen wurde durchflußzytometrisch analysiert und wird durch blaue Profile dargestellt.

Diese Beobachtungen zeigen, dass in einem klassischen Suppressionsansatz nach polyklonaler Stimulation kein Unterschied in der suppressiven Aktivität zwischen autologen und allogenen nTreg-Zellen zu erkennen ist.

3.3 Suppression von Tresp-Zellen nach allogener Stimulation

Während *in vitro* nach polyklonaler Stimulation sowohl autologe als auch allogene nTreg-Zellen die Proliferation von Tresp-Zellen supprimieren (Abschnitt 3.2), zeigten die allogenen KMT-Studien von Hoffmann et al. (161), dass sich autologe und allogene nTreg-Zellen bzgl. der GvHD-protectiven Wirkung unterschieden. Um die Verhältnisse bei diesen *in vivo* Studien besser *in vitro* zu simulieren, wurde in den weiteren Versuchen der Einfluss der MHC-Differenz auf die suppressive Funktion von nTreg-Zellen nach allogener Stimulation in gemischten Lymphozytenkulturen „mixed lymphocyte reactions“ (MLRs) analysiert, wobei folgende Stimulationsansätze verwendet wurden:

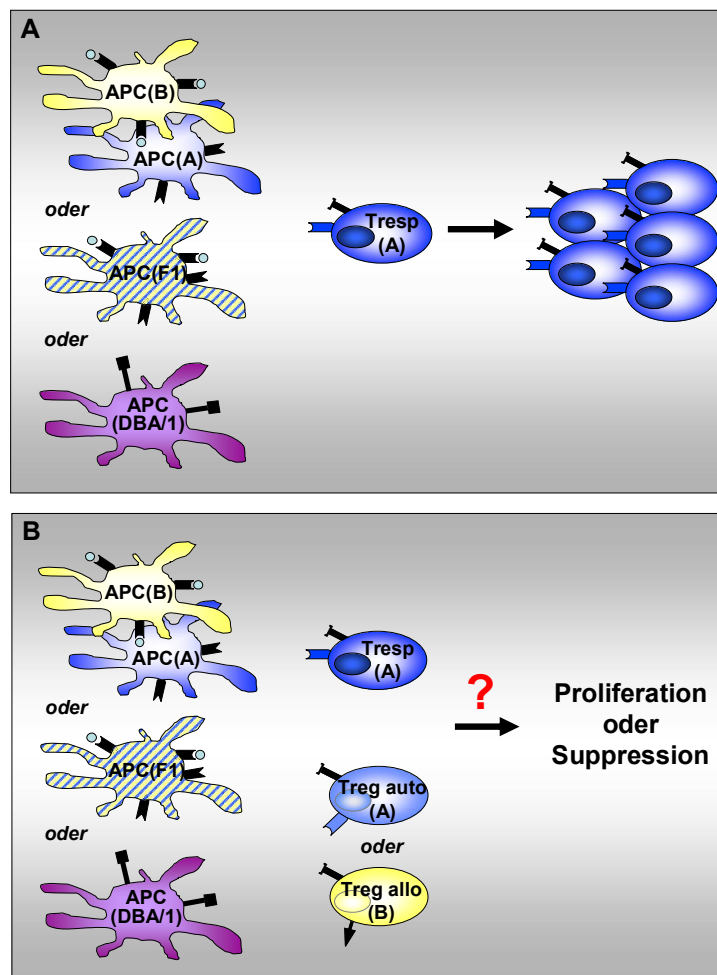


Abb. 3.5: Modellsystem zur Untersuchung des Einflusses der MHC-Differenz auf die suppressive Aktivität von nTreg-Zellen mittels „mixed lymphocyte reaction“ (MLR). Tresp-Zellen des Mausstamms A wurden (A) alleine oder (B) in Kokultur mit autologen (Mausstamm A) bzw. allogenen (Mausstamm B) nTreg-Zellen für sechs bis sieben Tage inkubiert. Für eine allogene Stimulation aller T-Zellsubpopulationen wurden entweder APCs beider Mausstämme (APCs A und APCs B = mixed APCs), APCs aus der F1-Tochtergeneration beider Mausstämme (A x B = F1 APCs), oder APCs eines Drittpenderstamms (DBA/1 APCs) verwendet.

Tresp-Zellen eines Mausstammes A wurden entweder alleine (**Abb. 3.5 A**), oder in Kokultur mit autologen, d.h. MHC-identen (Mausstamm A) bzw. allogenen, d.h. MHC-differenten (Mausstamm B) nTreg-Zellen (**Abb. 3.5 B**) inkubiert. Die Stimulation erfolgte durch allogene APCs auf drei unterschiedliche Arten. In einem ersten Ansatz wurde eine Mischung von APCs beider Mausstämme (A und B) eingesetzt, die als „mixed APCs“ bezeichnet werden. Dadurch können sowohl Tresp-Zellen als auch beide nTreg-Zellpopulationen (autolog bzw. allogene) durch MHC-differente APC-Populationen stimuliert werden. In einem weiteren Ansatz wurden APCs der F1-Tochtergeneration beider Mausstämme (A x B) eingesetzt (= F1 APCs), die beide MHC-Haplotypen auf ihrer Oberfläche tragen und somit die Stimulation beider T-Zellpopulationen über dieselben APCs ermöglichen. Als dritte Variante wurden APCs eines Drittspenderstamms verwendet, die einen fremden MHC-Haplotyp tragen, und somit ebenfalls alle beteiligten T-Zellpopulationen stimulieren. Tresp-Zellen wurden mit nTreg-Zellen im Verhältnis 1:1 sechs bis sieben Tage in Kultur gehalten. Als Auswertekriterium für die suppressive Aktivität von nTreg-Zellen diente die Proliferation der Tresp-Zellen.

3.3.1 Suppression der Proliferation nach allogener Stimulation – Unterschiedliche Wirkung autologer und allogener nTreg-Zellen

3.3.1.1 Nachweis mittels ^3H -Thymidin-Einbau

Zunächst wurde die dosisabhängige suppressive Aktivität autologer nTreg-Zellen mittels ^3H -Thymidin-Einbau untersucht (**Abb. 3.6**). Hierbei wurden 100.000 $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ Tresp-Zellen des C57BL/6 Mausstammes mit 100.000 allogenen APCs (Mausstamm BALB/c) stimuliert. Nach sechs Tagen konnte ein ^3H -Thymidin-Einbau und damit eine starke Proliferation gemessen werden. Die Zugabe von 100.000 nTreg-Zellen führte dagegen zu einem stark verminderten Einbau von ^3H -Thymidin, was auf eine Suppression der Proliferation von Tresp-Zellen hindeutet. Nach Titration der nTreg-Zellen konnte bis zu einem Tresp:Treg Zellverhältnis von 8:1 eine signifikante Inhibition der Proliferation alloreaktiver CD4^+ T-Zellen beobachtet werden. Allogen stimulierte $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ nTreg-Zellen alleine zeigten erwartungsgemäß keinen ^3H -Thymidin-Einbau.

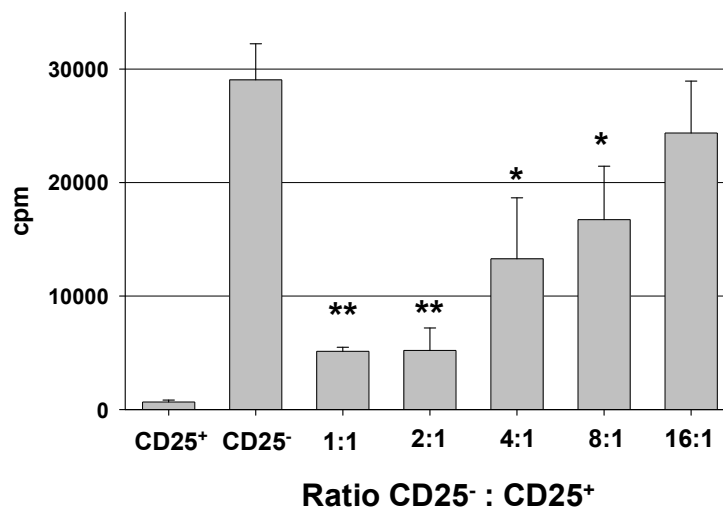


Abb. 3.6: Dosisabhängige Suppression von $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen durch autologe $CD4^+CD25^+$ nTreg-Zellen. Frisch isolierte $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen (C57BL/6) wurden zusammen mit titrierten Mengen an autologen nTreg-Zellen allogenen stimuliert. Nach sechs Tagen wurde die Proliferation der Tresp-Zellen mittels 3H -Thymidin-Einbau gemessen. Als Kontrollen dienten Tresp-Zellen ($CD25^-$) bzw. nTreg-Zellen ($CD25^+$) alleine in Kokultur mit allogenen APCs. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD von Dreifachwerten. Statistisch signifikante Unterschiede zum Kontrollansatz ($CD25^-$ alleine) sind mit einem Stern gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; Student's T-Test).

Durch den Nachweis der dosisabhängigen regulatorischen Funktion von nTreg-Zellen auf die Proliferation autologer Tresp-Zellen stellte sich die Frage, ob nTreg-Zellen nach allogener Stimulation auch auf allogene Tresp-Zellen suppressiv wirken können. Aus diesem Grund wurden $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen der Stämme BALB/c ($H-2^d$) oder C57BL/6 ($H-2^b$) mit jeweils autologen (nTreg auto) oder allogenen (nTreg allo) nTreg-Zellen im Verhältnis 1:1 kokultiviert und sechs Tage mit F1 APCs ($H-2^{bd}$) stimuliert. 3H -Thymidin wurde 16 Stunden vor Kulturende zugegeben. Wie in **Abb. 3.7** dargestellt, führte in beiden Ansätzen (BALB/c und C57BL/6 Tresp-Zellen) die Anwesenheit von autologen nTreg-Zellen zu einem stark verminderten Einbau von 3H -Thymidin. Im Gegensatz dazu zeigten die Ansätze mit allogenen nTreg-Zellen einen zwar gegenüber den Kontrollansätzen verminderten, aber doch deutlichen Einbau von 3H -Thymidin, was wiederum auf eine Proliferation der Tresp-Zellen hindeutet.

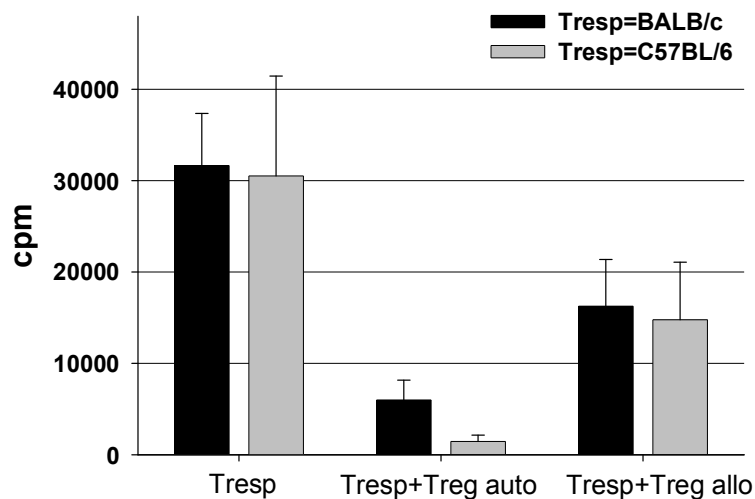


Abb. 3.7: ^3H -Thymidin-Einbau von Tresp-Zellen in Anwesenheit von autologen oder allogenen nTreg-Zellen. Frisch isolierte $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ Tresp-Zellen der Stämme BALB/c (schwarze Balken, H-2^d) oder C57BL/6 (graue Balken, H-2^b) wurden mit F1 APCs (H-2^{bd}) allogenen stimuliert. Zusätzlich enthielten die Kokulturen autologe (nTreg auto) oder allogene nTreg-Zellen (nTreg allo) im Verhältnis 1:1. Die Stimulation erfolgte für 6 Tage, die Zugabe von ^3H -Thymidin für die letzten 16 Stunden. Die Abb. ist repräsentativ für vier unabhängig durchgeführte Experimente.

3.3.1.2 Nachweis mittels CFSE-Verdünnungsassay

Die Methode des ^3H -Thymidin-Einbaus erlangt nur eine quantitative Aussage über die Proliferation eingesetzter T-Zellen innerhalb der letzten 16 Stunden vor Kulturende. Außerdem ist keine Differenzierung zwischen der Proliferation der einzelnen T-Zellpopulationen möglich. CFSE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an zytoplasmatische Proteine der Zelle bindet. Bei Teilung der Zelle wird dieser zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben, was durch eine Fluoreszenzabnahme im Durchflußzytometer sichtbar wird.

Durchflußzytometrische Analysen nach CFSE-Markierung einer oder beider in den hier verwendeten Kokulturen eingesetzter T-Zellpopulationen erlauben dagegen eine Aussage sowohl über das Proliferationsverhalten von Tresp-Zellen, als auch von nTreg-Zellen. Sie ermöglichen zudem eine Differenzierung zwischen CD4^+ und CD8^+ Tresp-Zellen und können eine Aussage über das Verhältnis zwischen Tresp- und nTreg-Zellen geben.

Für die folgenden Versuche wurden frisch isolierte BALB/c $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ und $\text{CD8}^+\text{CD25}^-$ (Verhältnis 2:1) Tresp-Zellen CFSE markiert und entweder mit mixed APCs (**Abb. 3.8 A**), F1 APCs (**Abb. 3.8 B**) oder DBA/1 APCs (**Abb. 3.8 C**) stimuliert. Die Stimulation der Tresp-

Zellen erfolgte entweder alleine oder in Anwesenheit autologer BALB/c (H-2^d; CD90.2) bzw. allogener C57BL/6 (H-2^b) nTreg-Zellen. Um in den Ansätzen Tresp-Zellen von autologen nTreg-Zellen durchflußzytometrisch unterscheiden zu können, wurden die Tresp-Zellen aus dem kongenen Mausstamm BALB/c (CD90.1) isoliert, während die nTreg-Zellen aus BALB/c (CD90.2) Wildtyptieren gewonnen wurden. Nach sechs bis sieben Tagen in Kultur wurden die Zellen geerntet und die Proliferation der Tresp-Zellen durchflußzytometrisch analysiert.

Abb. 3.8 A I zeigt, dass nach sechs Tagen allogener Stimulation mit mixed APCs $57,9\% \pm 1,7\%$ der CD4⁺/CD8⁺ Tresp-Zellen proliferierten (Mittelwert \pm SD aus n=3 Experimenten). In Kokultur mit autologen nTreg-Zellen konnte diese Proliferation fast vollständig unterdrückt werden ($8,5\% \pm 5,1\%$), während allogene nTreg-Zellen keine suppressive Wirkung zeigten ($57,2\% \pm 1,4\%$ proliferierende Tresp-Zellen). Eine Analyse der Tresp-Zellen getrennt nach CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ergab in Kulturen ohne nTreg-Zellen eine Proliferation von $26,0\% \pm 3,0\%$ unter den CD4⁺ und $86,2\% \pm 2,2\%$ unter den CD8⁺ T-Zellen. In Anwesenheit von autologen nTreg-Zellen kam es in beiden Zellpopulationen zu einer signifikanten Inhibition der Proliferation (CD4⁺: $9,1\% \pm 4,7\%$; CD8⁺: $25,1\% \pm 4,9\%$), während in Kokulturen mit allopathen nTreg-Zellen keine Suppression der Proliferation in CD4⁺ ($22,1\% \pm 1,8\%$) und CD8⁺ ($89,6\% \pm 0,4\%$) T-Zellen gemessen wurde (**Abb. 3.8 AII**).

Um eine Stimulation der einzelnen T-Zellpopulationen auch über dieselben APCs gewährleisten zu können, wurden Tresp- und nTreg-Zellen im folgendem mit F1 APCs (H-2^{bd}) oder APCs eines Drittsponderstamms (DBA/1; H-2^q) stimuliert (**Abb. 3.8 B/C**). Die Allostimulation mit F1 APCs führte zur Proliferation von $21,9\% \pm 1,8\%$ der CD4⁺ und $71,9\% \pm 1,7\%$ der CD8⁺ T-Zellen (Mittelwert \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten). Kokultivierte autologe nTreg-Zellen zeigten erwartungsgemäß eine suppressive Wirkung auf die Proliferation sowohl der CD4⁺ ($2,7\% \pm 0,1\%$) als auch der CD8⁺ ($20,6\% \pm 4,1\%$) Tresp-Zellen, während allogene nTreg-Zellen auch bei dieser Konstellation keine inhibitorische Funktion aufweisen konnten (CD4⁺: $13\% \pm 1,9\%$ und CD8⁺: $90,4\% \pm 2,9\%$) (**Abb. 3.8 BI/II**). Die Stimulation mit DBA/1 APCs (CD4⁺: $26,6\% \pm 2,9\%$; CD8⁺: $74,2\% \pm 4,3\%$) zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied in der suppressiven Aktivität zwischen autologen und allopathen nTreg-Zellen. CD4⁺/CD8⁺ (2:1) Tresp-Zellen wurden nur von autologen (CD4⁺: $2,2\% \pm 0,7\%$; CD8⁺: $10,8\% \pm 3,0\%$), nicht aber von allopathen nTreg-Zellen supprimiert (CD4⁺: $12,4\% \pm 4,8\%$; CD8⁺: $89,7\% \pm 4,7\%$) (**Abb. 3.8 CI/II**).

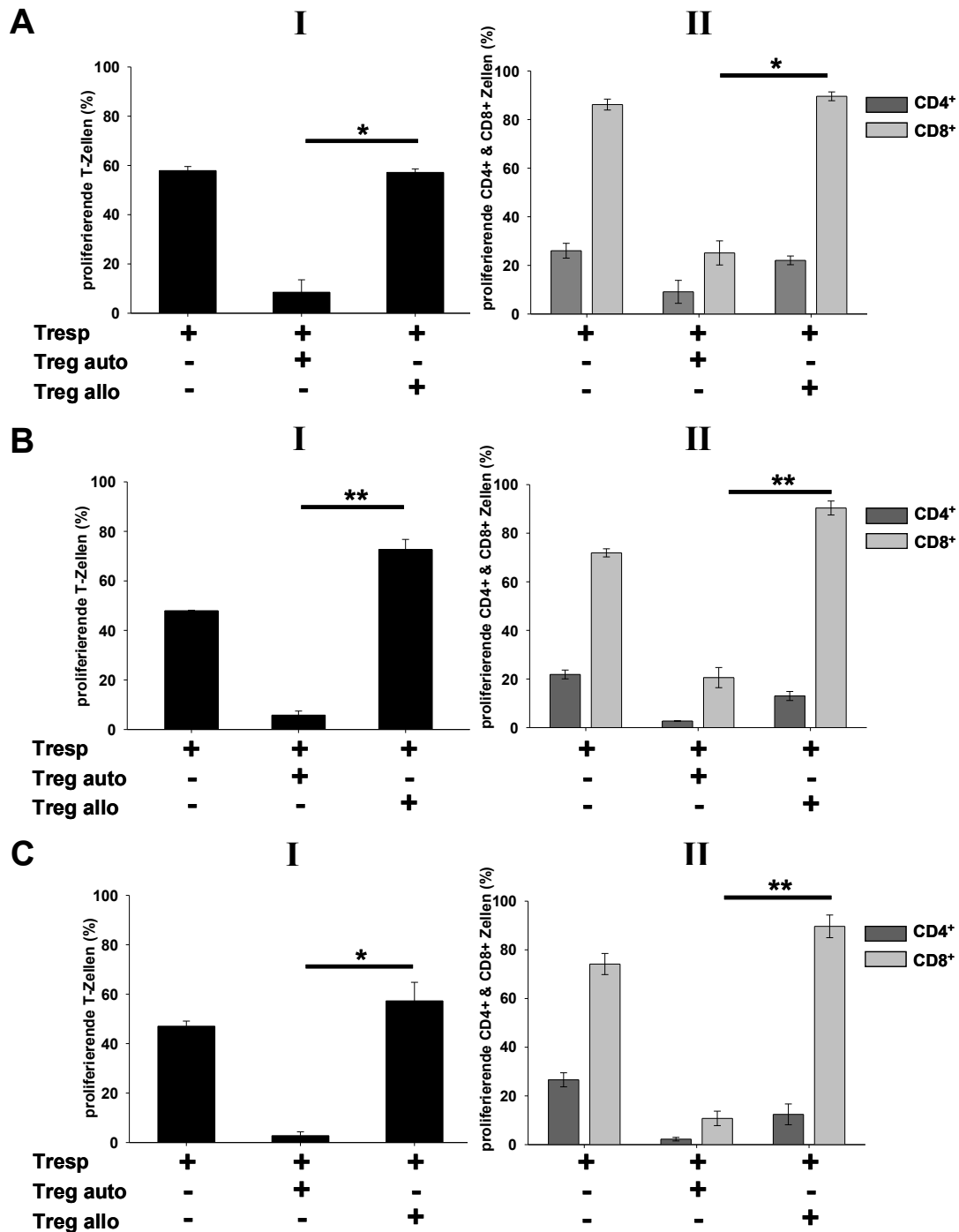


Abb. 3.8: Suppression der Proliferation von BALB/c CD90.1 Tresp-Zellen durch autologe, nicht aber durch allogene nTreg-Zellen. CD4⁺/CD8⁺ (2:1) Tresp-Zellen aus BALB/c CD90.1 (H-2^d) Mäusen wurden mit (A) mixed APCs (BALB/c & C57BL/6; H-2^d & H-2^b), (B) F1 APCs (H-2^{bd}), oder (C) DBA/1 APCs (H-2^d) 6-7 Tage stimuliert. Tresp-Zellen wurden dabei entweder alleine oder mit autologen (nTreg auto, H-2^d) bzw. allogenen (nTreg allo, H-2^b) nTreg-Zellen kokultiviert. Dargestellt ist (I) der Anteil proliferierender Zellen unter allen Tresp-Zellen und (II) der Anteil proliferierender Zellen unter CD4⁺ bzw. CD8⁺ Tresp-Zellen, gemessen anhand ihrer CFSE-Markierung. Die Analyse erfolgte nach Identifizierung der jeweiligen Zellpopulation anhand ihrer spezifischen Oberflächenmarker. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der suppressiven Aktivität autologer und allogener nTreg-Zellen ist mit einem Stern gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

Um auszuschließen, dass der unterschiedliche suppressive Effekt von autologen und allogenen nTreg-Zellen auf einer verminderten Funktion von nTreg-Zellen des verwendeten Mausstamms zurückzuführen ist, wurden in weiteren Ansätzen statt BALB/c Tresp-Zellen solche des Mausstamms C57BL/6 eingesetzt. Zur Unterscheidung von Tresp- und autologen nTreg-Zellen wurden die Tresp-Zellen aus kongenen C57BL/6 (CD45.1) Tieren verwendet. Dazu wurden autologe (nTreg auto) nTreg-Zellen aus C57BL/6 (CD45.2) Mäusen (H-2^b) und allogene (nTreg allo) nTreg-Zellen aus BALB/c Mäusen (H-2^d) isoliert. Außerdem wurden die T-Zellpopulationen mit drei unterschiedlichen APCs (mixed APCs; F1 APCs; DBA/1 APCs) stimuliert.

Abb. 3.9 A zeigt die Proliferation von CD4⁺ (7,0% ± 0,6%) und CD8⁺ (70,5% ± 11,1%) Tresp-Zellen nach allogener Stimulation mit mixed APCs. Die Koinkubation mit autologen C57BL/6 nTreg-Zellen führte zu einer fast vollständigen Suppression der Proliferation alloreaktiver Tresp-Zellen (CD4⁺: 2,1% ± 0,2%; CD8⁺: 12,1% ± 1,2%). Dagegen übten allogene BALB/c nTreg-Zellen keine suppressive Funktion gegenüber Tresp-Zellen aus (CD4⁺: 4,3% ± 0,3%; CD8⁺: 87,2% ± 3,7%).

Auch nach allogener Stimulation mit F1 (**Abb. 3.9 B**) oder DBA/1 (**Abb. 3.9 C**) APCs, konnte eine Proliferation der CD4⁺ (16,3% ± 1,1% bzw. 16,6% ± 4,3%) und CD8⁺ (83,1% ± 1,8% bzw. 83,5% ± 5,3%) Tresp-Zellen beobachtet werden. In Anwesenheit autologer nTreg-Zellen wurde die Proliferation sowohl nach Stimulation mit F1 APCs (CD4⁺: 4,2% ± 1,3%; CD8⁺: 21,0% ± 4,7%), als auch mit DBA/1 APCs (CD4⁺: 4,3% ± 2,4%; CD8⁺: 7,5% ± 4,8%) fast vollständig inhibiert. Dagegen konnten allogene nTreg-Zellen weder nach F1-Stimulation (CD4⁺: 8,1% ± 1,8%; CD8⁺: 87,9% ± 1,6%), noch nach DBA/1 Stimulation (CD4⁺: 13,1% ± 1,9; CD8⁺: 79,7% ± 0,6%) eine inhibitorische Funktion ausüben. In allen drei Ansätzen konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der suppressiven Aktivität autologer und allogener nTreg-Zellen gezeigt werden (p<0,05).

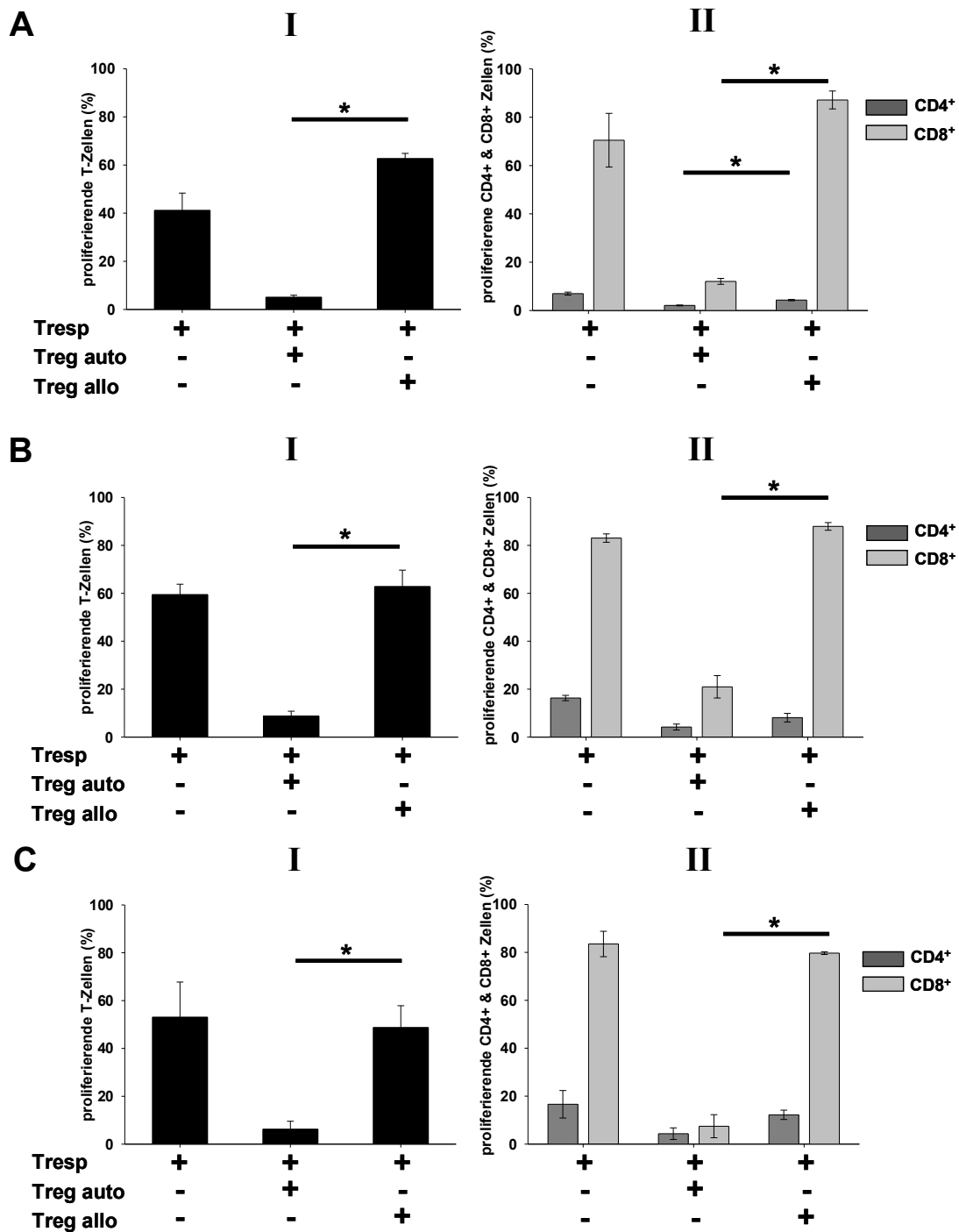


Abb. 3.9: Suppression der Proliferation von C57BL/6 CD45.1 Tresp-Zellen durch autologe, nicht aber durch allogene nTreg-Zellen. CD4⁺/CD8⁺ (2:1) Tresp-Zellen wurden aus C57BL/6 CD45.1 (H-2^b) Mäusen isoliert und für sieben Tagen mit (A) mixed APCs (BALB/c & C57BL/6; H-2^d & H-2^b), (B) F1 APCs (H-2^{b/d}) oder (C) DBA/1 APCs (H-2^d) stimuliert. Tresp-Zellen wurden mit autologen (nTreg auto, H-2^d) oder allogenen (nTreg allo, H-2^b) nTreg-Zellen im Verhältnis 1:1 kokultiviert. Dargestellt ist (I) der Anteil proliferierender Zellen unter allen Tresp-Zellen und (II) der Anteil proliferierender Zellen unter CD4⁺ bzw. CD8⁺ Tresp-Zellen, gemessen anhand ihrer CFSE-Markierung. Die Analyse erfolgte nach Identifizierung der jeweiligen Zellpopulation anhand ihrer spezifischen Oberflächenmarker. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm SD aus 3 (A) bzw. 2 (B, C) unabhängigen Experimenten. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der suppressiven Aktivität autologer und allogener nTreg-Zellen ist mit einem Stern gekennzeichnet (* $p < 0,05$).

Nachdem gezeigt wurde, dass $CD4^+/CD8^+$ Tresp-Zellen nur von nTreg-Zellen des gleichen Mausstamms inhibiert wurden, lag die Vermutung nahe, dass die MHC-Kompatibilität zwischen Tresp- und nTreg-Zellen tatsächlich eine Rolle in der suppressiven Aktivität von nTreg-Zellen spielt. Als nächstes sollte deshalb geklärt werden, ob Tresp-Zellen auch von nTreg-Zellen unterdrückt werden, die zwar den gleichen MHC-Haplotyp (MHC-ident) exprimieren, jedoch einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund aufweisen.

Zu diesem Zweck wurden $CD4^+CD25^-$ und $CD8^+CD25^-$ Tresp-Zellen aus DBA/2 ($H-2^d$) Mäusen isoliert und mit nTreg-Zellen aus BALB/c Mäusen (nTreg BALB/c, $H-2^d$), oder aus C57BL/6 ($H-2^b$ = nTreg allo) kokultiviert. Nach sechstägiger MLR wurden die Zellen geerntet, mit den spezifischen Oberflächenantikörpern H-2K^d, H-2K^b, CD90.1, CD8, CD4 und CD25 gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Die Proliferation der Tresp-Zellen konnte durch deren CFSE-Ausverdünnung untersucht werden.

Abb. 3.10 stellt den unterschiedlichen suppressiven Effekt zwischen MHC-identen und MHC-differenten nTreg-Zellen dar.

Die Inkubation mit mixed APCs (**Abb. 3.10 A**) bzw. DBA/1 APCs (**Abb. 3.10 B**) führte zu einer Proliferation von $41,8\% \pm 11,1\%$ bzw. $56,1\% \pm 10,0\%$ der CFSE gefärbten Tresp-Zellen. Die Kokultivierung mit MHC-identen BALB/c nTreg-Zellen führte sowohl nach Stimulation mit mixed APCs ($10,4\% \pm 4,2\%$) als auch nach Stimulation mit DBA/1 APCs ($6,7\% \pm 2,3\%$) zu einer Suppression der Alloresponse. In Gegenwart von MHC-differenten C57BL/6 nTreg-Zellen konnte dagegen wiederum keine Inhibition der Proliferation von Tresp-Zellen festgestellt werden (mixed APCs: $56,9\% \pm 1,1\%$; DBA/1: $65,5\% \pm 2,4\%$).

Die separate Analyse von $CD4^+$ und $CD8^+$ Tresp-Zellen zeigte nach Stimulation mit mixed APCs $30,2\% \pm 7\%$ Proliferation unter den $CD4^+$ Tresp-Zellen, die durch MHC-idente nTreg-Zellen auf $9,3\% \pm 5,9\%$, durch MHC-differente nTreg-Zellen dagegen nur auf $19,2\% \pm 3,7\%$ reduziert wurde. Unter den $CD8^+$ Tresp-Zellen proliferierten $40,7\% \pm 12,7\%$ nach Stimulation mit mixed APCs. Dies wurde durch MHC-idente nTreg-Zellen weitgehend inhibiert ($17,8\% \pm 7,9\%$), wohingegen MHC-differente nTreg-Zellen keine Suppression bewirkten ($59,1\% \pm 1,5\%$).

Unter Verwendung von DBA/1 APCs konnte ebenfalls die Proliferation der $CD4^+$ Tresp-Zellen ($20,5\% \pm 3,0\%$) nur in Anwesenheit von MHC-identen nTreg-Zellen ($8,3\% \pm 0,4\%$), nicht aber von MHC-differenten nTreg-Zellen ($19,6\% \pm 0,3\%$) unterdrückt werden. Unter den $CD8^+$ Tresp-Zellen wurde nach allogener Stimulation mit DBA/1 APCs eine Proliferation von $59,1\% \pm 1,5\%$ gemessen, die nur durch MHC-idente nTreg-Zellen auf $6,3\% \pm 6,4\%$ reduziert wurde. Dagegen waren MHC-differente nTreg-Zellen nicht in der Lage die Proliferation von $CD8^+$ Tresp-Zellen zu inhibieren ($79,4\% \pm 1,1\%$).

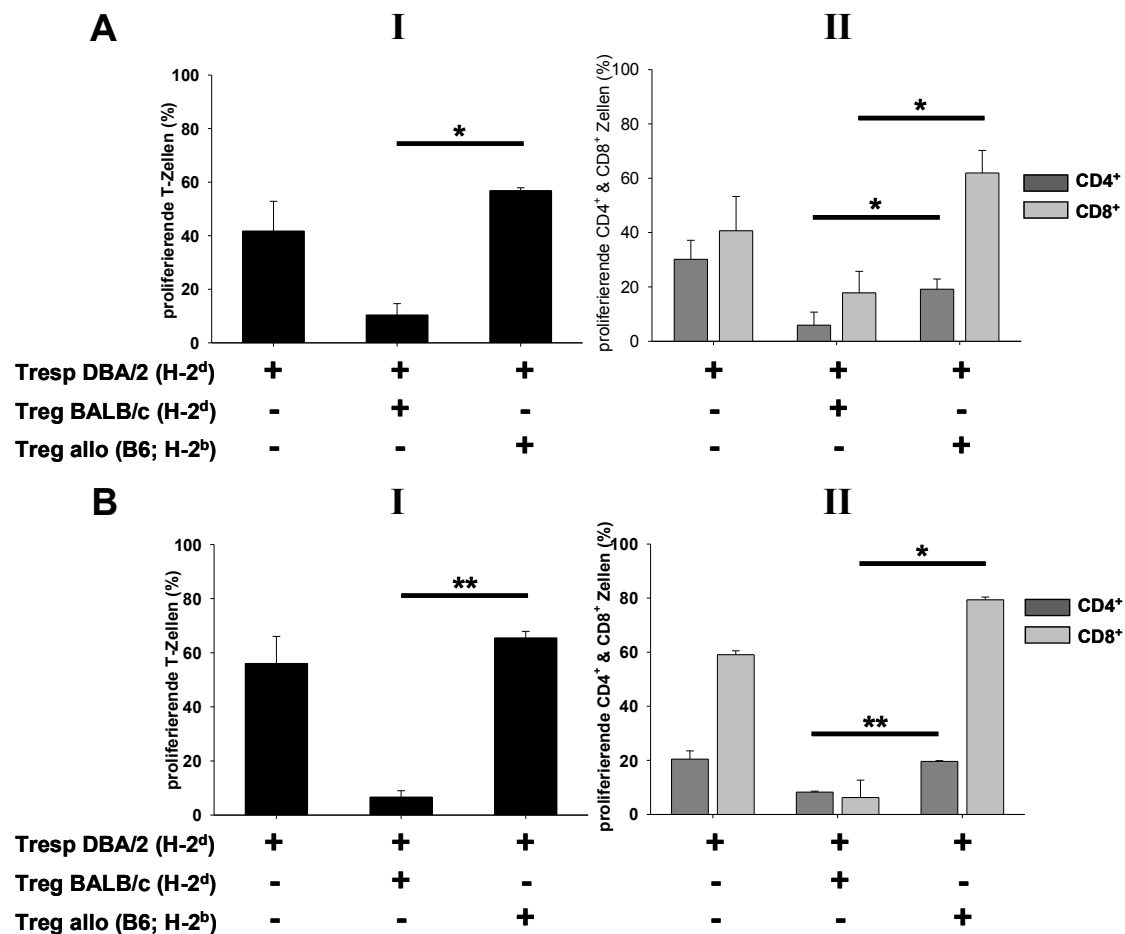


Abb. 3.10: Suppression der Proliferation von Tresp-Zellen durch MHC-identen aber Mausstamm-differente nTreg-Zellen. CD4⁺/CD8⁺ Tresp-Zellen des Mausstamm DBA/2 (H-2^d) wurden mit **(A)** mixed APCs (BALB/c & C57BL/6, H-2^d & H-2^b) oder **(B)** DBA/1 APCs (H-2^q) stimuliert. Untersucht wurde die suppressive Aktivität von MHC-identen aber Mausstamm-differenten (Treg MHC-ident, BALB/c=H-2^d) und MHC-differenten (Treg allo, B6=H-2^b) nTreg-Zellen. Dargestellt ist **(I)** der Anteil proliferierender Zellen unter allen Tresp-Zellen und **(II)** der Anteil proliferierender Zellen unter CD4⁺ bzw. CD8⁺ Tresp-Zellen, gemessen anhand ihrer CFSE-Markierung. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm Varianz aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der suppressiven Aktivität autologer und allogener nTreg-Zellen ist mit einem Stern gekennzeichnet (** $p < 0,001$; * $p < 0,05$).

3.3.2 Vitalität allogener nTreg-Zellen in MLRs

Ein möglicher Grund für die fehlende suppressive Aktivität allogener CD4⁺CD25⁺ nTreg-Zellen könnte deren Zerstörung durch alloreaktive CD8⁺ T-Zellen sein. Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurden in den folgenden Versuchen nur nicht-zytotoxische CD4⁺CD25⁻ Tresp-Zellen in der MLR verwendet.

CFSE-markierte BALB/c (CD90.1) CD4⁺CD25⁻ Tresp-Zellen wurden alleine (Tresp) oder in Kokultur mit autologen BALB/c (CD90.2, nTreg auto) bzw. allogenen C57BL/6 (nTreg allo)

nTreg-Zellen mit mixed APCs stimuliert. Nach sechstägiger MLR wurden die Zellen geerntet, auf die Oberflächenmarker CD4, CD25, CD90.1, H-2K^b und H-2K^d gefärbt und im FACS analysiert. Die Proliferation konnte anhand der CFSE-Ausverdünnung untersucht werden.

Wie in **Abb. 3.11** dargestellt, proliferierten $51,0\% \pm 7,3\%$ ($n=3$ unabhängige Experimente) der Tresp-Zellen nach allogener Stimulation mit mixed APCs. Auch in dieser Situation erfolgte nur in Anwesenheit von autologen BALB/c nTreg-Zellen eine Inhibition der Proliferation ($7,4\% \pm 2,9\%$), während allogene C57BL/6 nTreg-Zellen wiederum nicht in der Lage waren, die Expansion der Tresp-Zellen zu unterdrücken ($47,8\% \pm 4\%$).

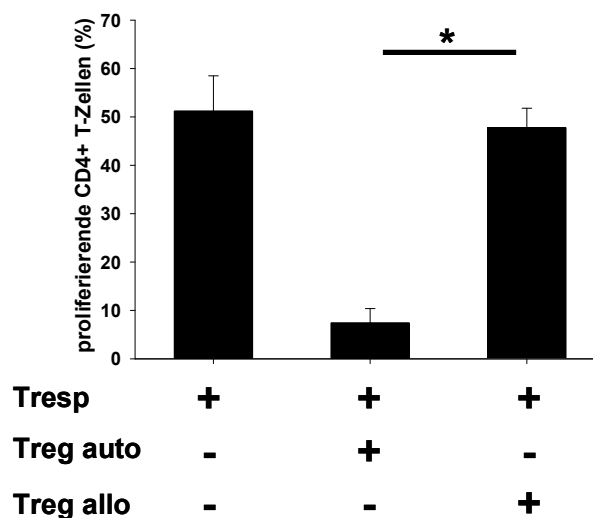


Abb. 3.11: Suppression der Proliferation von CD4⁺CD25⁻ Tresp-Zellen durch autologe, nicht aber durch allogene nTreg-Zellen. CD4⁺CD25⁻ Tresp-Zellen wurden aus BALB/c (CD90.1; H-2^d) Mäusen isoliert und mit mixed APCs und autologen (Treg auto, H-2^d) oder allogenen (Treg allo, H-2^b) nTreg-Zellen sechs Tage stimuliert. Tresp-Zellen die alleine mit allogenen APCs stimuliert wurden dienten als Kontrolle. Dargestellt ist der Anteil proliferierender Zellen unter den CD4⁺ Tresp-Zellen, gemessen anhand ihrer CFSE-Markierung. Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der suppressiven Aktivität autologer und allogener nTreg-Zellen ist mit einem Stern gekennzeichnet (* $p < 0,05$).

Damit konnte ein signifikanter Unterschied in der suppressiven Aktivität von autologen und allogenen nTreg-Zellen auf die Proliferation von CD4⁺CD25⁻ Tresp-Zellen auch in Abwesenheit von CD8⁺ Tresp-Zellen nachgewiesen werden. Die fehlende suppressive Funktion von allogenen nTreg-Zellen kann unter diesen Bedingungen nicht durch zytotoxische Eigenschaften der Tresp-Zellen erklärt werden.

Ein weiterer Ansatz um eine mögliche Zerstörung allogener nTreg-Zellen auszuschließen, ist die Vitalität der nTreg-Zellen am Ende der Kultur mittels Färbung mit dem Vitalfarbstoff DAPI zu bestimmen. CD4⁺ und CD8⁺ Tresp-Zellen wurden aus dem Mausstamm BALB/c (CD90.2)

isoliert, mit CFSE markiert und alleine (Tresp) oder mit autologen (+Treg auto) bzw. allogenen (+Treg allo) nTreg-Zellen sechs Tage mit mixed APCs stimuliert.

Abb. 3.12 zeigt nach Stimulation mit mixed APCs unter den CD90.1⁻ (BALB/c; CD90.2) Tresp-Zellen eine Proliferation von 48,1%. In Kokultur mit autologen BALB/c (CD90.1) nTreg-Zellen war eine Inhibition der Proliferation von Tresp-Zellen zu erkennen, zudem waren nTreg-Zellen nach sieben Tagen Kultur immer noch nachweisbar (71,5% an vitalen nTreg-Zellen). Allogene nTreg-Zellen (C57BL/6; H-2K^b positiv) waren dagegen nicht in der Lage, die Proliferation der Tresp-Zellen (H-2K^b negativ) zu unterdrücken. Trotz fehlender Inhibition konnte jedoch ein Überleben allogener nTreg-Zellen auch in Gegenwart von CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden. Ihr Prozentsatz aus den Gesamtzellen war allerdings mit 23,7% wesentlich geringer als der der autologen nTreg-Zellen (71,5%). Dieser erhöhte Anteil an vitalen Tresp-Zellen lässt sich durch die starke Proliferation der Tresp-Zellen, trotz Anwesenheit der allogener nTreg-Zellen, erklären. Dies zeigt, dass sich die fehlende suppressive Wirkung allogener nTreg-Zellen in Anwesenheit von CD8⁺ Tresp-Zellen nicht durch ihre frühzeitige Zerstörung in der Kultur erklären lässt.

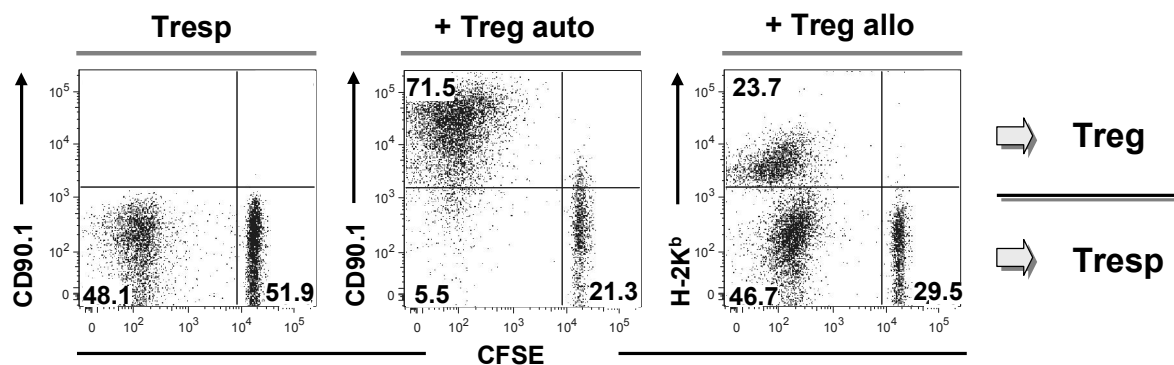


Abb. 3.12: Persistenz allogener nTreg-Zellen in Anwesenheit alloreaktiver Tresp-Zellen. CFSE gefärbte CD4⁺/CD8⁺ Tresp-Zellen des BALB/c Stamms alleine oder in Kokultur mit autologen BALB/c CD90.1 oder allogeneren C57BL/6 nTreg-Zellen für 7 Tage mit mixed APCs stimuliert. Sowohl die Persistenz der nTreg-Zellen, als auch die Proliferationsfähigkeit der Tresp-Zellen wurde durchflußzytometrisch analysiert. Die Dotplots zeigen die CFSE Expression vitaler CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen und autologer bzw. allogener nTreg-Zellen. Dargestellt ist eines von jeweils drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob vitale allogene nTreg-Zellen trotz fehlender suppressiver Funktion stimuliert waren. nTreg-Zellen können nach Stimulation über ihren TCR und in Gegenwart von pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-2) zur Proliferation gebracht werden. Aus diesem Grund wurde die Proliferationsfähigkeit von nTreg-Zellen in

Anwesenheit von allogen Tresp-Zellen untersucht, welche nach Stimulation bekanntermaßen IL-2 und andere pro-inflammatorische Zytokine produzieren.

Für diesen Ansatz wurden sowohl $CD4^+$ Tresp-Zellen (BALB/c, CD90.1) als auch autologe (BALB/c, CD90.2), oder allogene (C57BL/6) nTreg-Zellen mit CFSE markiert und in den entsprechenden Kokulturen sieben Tage mit mixed APCs stimuliert. Anschließend wurden die T-Zellpopulationen durchflußzytometrisch anhand ihrer FoxP3 Expression und CFSE-Ausverdünnung analysiert.

Wie in **Abb. 3.13** dargestellt, exprimierten proliferierende Tresp-Zellen wie erwartet kaum FoxP3 (2,1%), während sowohl kokultivierte autologe als auch allogene nTreg-Zellen eine FoxP3 Expression aufwiesen. Des Weiteren konnte die Proliferation von Tresp-Zellen nur durch autologe, nicht aber durch allogene nTreg-Zellen gehemmt werden.

Interessanterweise zeigten vor allem allogene nTreg-Zellen unter diesen Bedingungen eine starke Proliferation, die sogar die der Tresp-Zellen übertraf. nTreg-Zellen benötigen nicht nur die Stimulation über ihren TCR um zu proliferieren, sondern auch IL-2 aus exogenen Quellen. Eine solche Quelle scheinen unter diesen Bedingungen die stimulierten Tresp-Zellen darzustellen, die so den allogen nTreg-Zellen zur Expansion verhelfen.

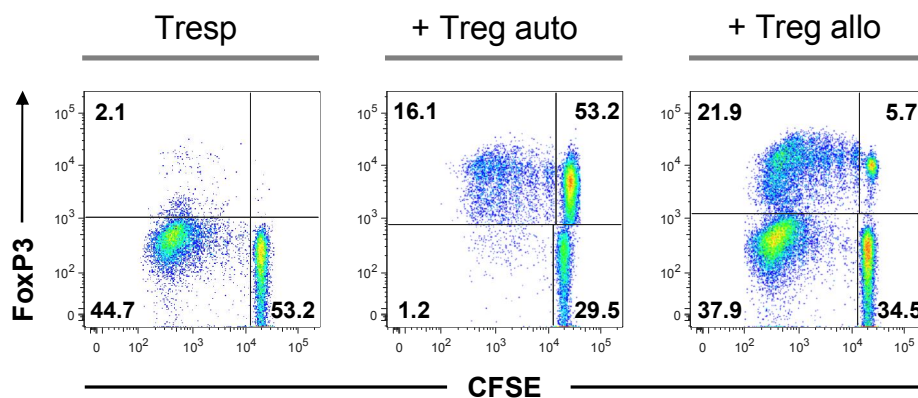


Abb. 3.13: Proliferation und FoxP3 Expression von CFSE gefärbten $CD4^+CD25^-$ Tresp- und $CD4^+CD25^+$ nTreg-Zellen. Tresp-Zellen des Mausstamms BALB/c (CD90.1) wurden mit mixed APCs für sieben Tage stimuliert und mit autologen (BALB/c) bzw. allogen (C57BL/6) nTreg-Zellen kokultiviert. Dargestellt ist die FoxP3 Expression und Proliferation von CFSE gefärbten Tresp- und nTreg-Zellen, welche durch die Fluoreszenzabnahme am Durchflußzytometer analysiert wurden. Gezeigt ist eines von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

3.3.3 Suppression der Zytokinexpression nach allogener Stimulation – Differentielle Wirkung von autologen und allogenen nTreg-Zellen

Die allogene Stimulation von Tresp-Zellen führt neben der Proliferation auch zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-2, IFN- γ und TNF. Diese spielen in der akuten GvHD eine wichtige Rolle, da IL-2 und IFN- γ u.a. CTLs aktivieren, die ihrerseits durch Ausschüttung von z.B. TNF pro-inflammatorisch wirken und Schäden am Empfängergewebe verursachen (150). Es wurde *in vitro* gezeigt, dass die Zytokinsekretion von Tresp-Zellen durch CD4⁺CD25⁺ nTreg-Zellen weitgehend unterdrückt werden kann (75). Im Folgenden sollte deshalb untersucht werden, ob nur autologe oder auch allogene nTreg-Zellen die Zytokinproduktion von CD4⁺ und CD8⁺ Tresp-Zellen inhibieren.

BALB/c (CD90.1) CD4⁺/CD8⁺ Tresp-Zellen wurden alleine oder in Kokultur mit autologen bzw. allogenen nTreg-Zellen für fünf Tage mit mixed APCs stimuliert. Für die Untersuchung der Zytokinproduktion der Tresp- und nTreg-Zellen wurden diese anschließend für vier Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert. PMA aktiviert stellvertretend für den CD28 Signalweg die PKC und den MAPK-Signalweg, während das Ca²⁺ Ionophor Ionomycin einen anhaltenden extrazellulären Ca²⁺ Einstrom, wie er normalerweise durch den TCR ausgelöst wird, induziert. Nach vierstündiger PMA/Ionomycin Stimulation, wurde intrazellulär die Expression von FoxP3, IL-2, IFN- γ und TNF durchflußzytometrisch bestimmt. Wie in **Abb. 3.14 A** dargestellt, produzierten 6,3% der CD4⁺/CD8⁺ Tresp-Zellen nach allogener Stimulation IL-2, 29,3% TNF und 15,8% IFN- γ . In Anwesenheit von autologen nTreg-Zellen (+Treg auto) kam es zu einer Suppression der Zytokinproduktion, denn nun produzierten nur noch 1% der FoxP3⁺ Tresp-Zellen IL-2, 14,2% TNF und 1,5% IFN- γ . Interessanterweise zeigten parallel hierzu 27,5% der autologen nTreg-Zellen ebenfalls eine TNF-Produktion. Dies wurde in Kokulturen mit allogenen nTreg-Zellen (+Treg allo) nicht beobachtet. Ebenso wenig kam es zu einer Inhibition der Zytokinproduktion von Tresp-Zellen; sowohl IL-2 (4,8%), als auch TNF (24,9%) und IFN- γ (19,6%) wurden von ihnen im normalen Umfang exprimiert (Die Prozentangaben beziehen sich auf Tresp-Zellen). Die separate Analyse von CD4⁺ (**Abb. 3.14 B**) und CD8⁺ (**Abb. 3.14 C**) Tresp-Zellen ergab unter den CD4⁺ Tresp-Zellen 5,7% IL-2-, 22,3% TNF- und 12,2% IFN- γ - Produzenten. In Anwesenheit autologer nTreg-Zellen konnte eine Inhibition der Expression von IL-2 (1,8%) und IFN- γ (1,3%) beobachtet werden, während die TNF-Produktion unter den CD4⁺ Tresp-Zellen kaum unterdrückt wurde (19,2%). In Anwesenheit von allogenen nTreg-Zellen wurde weder die TNF- noch die IFN- γ -Produktion supprimiert (TNF: 21,1%; IFN- γ : 10,3%), die Frequenz IL-2 produzierender Zellen war jedoch leicht vermindert (2,7%). Unter den CD8⁺ Tresp-Zellen wurde die Produktion aller drei

Zytokine durch autologe nTreg-Zellen unterdrückt (IL-2: 0,5%; TNF: 10,0%; IFN- γ : 1,2%). Dagegen waren allogene nTreg-Zellen nicht in der Lage die Produktion von IL-2, TNF oder IFN- γ zu inhibieren (IL-2: 6,7%; TNF: 29,2%; IFN- γ : 25,4%).

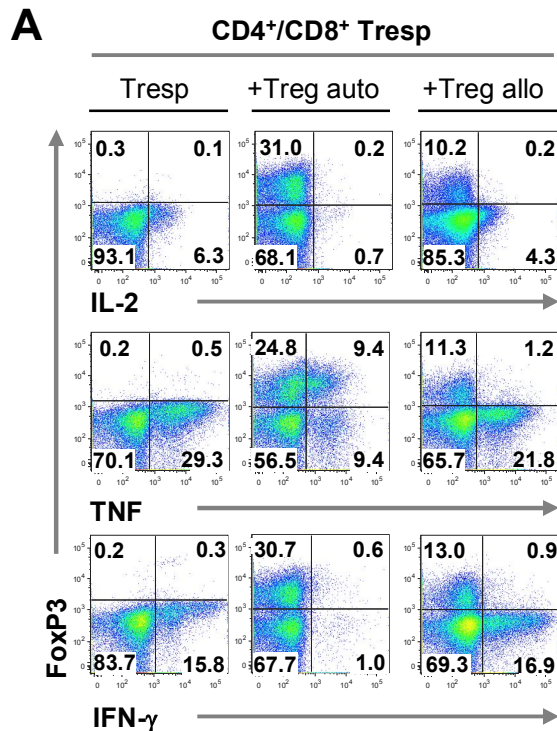
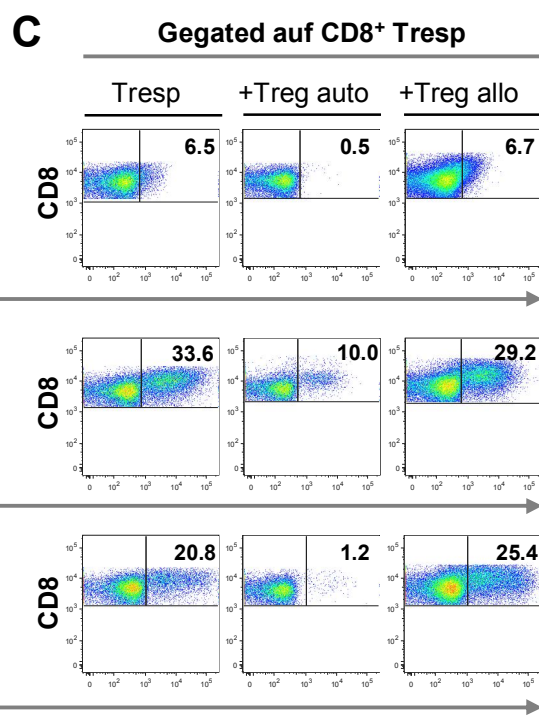
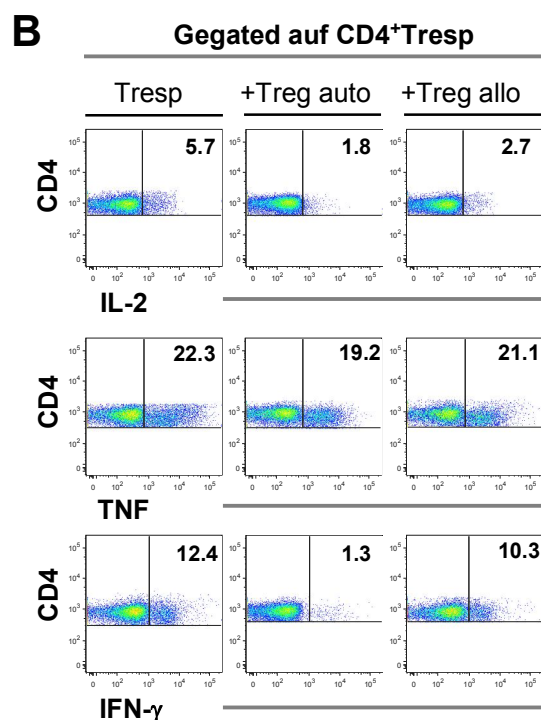


Abb. 3.14: Analyse der Zytokinproduktion von CD4⁺/CD8⁺FoxP3⁺ Tresp-Zellen in Kokultur mit autologen oder allogenen CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ nTreg-Zellen. (A) Dargestellt ist die Zytokinexpression von CD4⁺/CD8⁺ Tresp-Zellen (BALB/c CD90.1) alleine (Tresp) oder in Anwesenheit von autologen (+Treg auto; BALB/c; H-2^d) bzw. allogenen (+Treg allo; C57BL/6; H-2^b) nTreg-Zellen. Zusätzlich ist die Zytokinproduktion unter den (B) CD4⁺ und (C) CD8⁺ Tresp-Zellen dargestellt. Die Subpopulationen wurden in einer MLR für sechs Tage mit mixed APCs stimuliert, anschließend für vier Stunden mit PMA/Ionomycin inkubiert und ihre Produktion von IL-2, TNF und IFN- γ durchflußzytometrisch bestimmt. Gezeigt ist eines von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.



Als nächstes wurde untersucht, weshalb autologe nTreg-Zellen nicht in der Lage waren die TNF-Produktion von $CD4^+$ T-Zellen unter den Tresp-Zellen zu inhibieren. Um eine relevante Rolle der kokultivierten $CD8^+$ Tresp-Zellen hierbei auszuschließen, wurden die Versuche mit $CD4^+CD25^-$ T-Zellen als alleinige Tresp-Zellen wiederholt. Diese wurden mit autologen- bzw. allogenen nTreg-Zellen für sechs Tage mit mixed APCs stimuliert, gefolgt von einer vierstündigen Stimulation mit PMA/Ionomycin. Anschließend wurde die Zellen auf ihre FoxP3 Expression und Zytokinproduktion im FACS analysiert. **Abb. 3.15** zeigt die Ergebnisse von einem aus zwei unabhängig durchgeführten Versuchen. Für sich alleine kultivierte $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen zeigten nach allogener Stimulation nur eine marginale FoxP3 Induktion und enthielten 9.8% IL-2-, 7,2% IFN- γ - und einen auffallend hohen Anteil (44,7%) an TNF-Produzenten. Die Kokultur mit autologen nTreg-Zellen führte unter den FoxP3 $^-$ Tresp-Zellen nicht nur zu einer verringerten IL-2 und IFN- γ Expression (4.2% und 1,8%; bezogen auf die FoxP3 $^-$ Tresp-Zellen) sondern auch auf eine deutliche Verringerung der TNF-Produzenten (17,9%). Gleichzeitig kam es wiederum zu einer starken TNF-Produktion unter den nTreg-Zellen (33,5%; bezogen auf die nTreg-Zellpopulation). Im Gegensatz dazu waren allogene nTreg-Zellen nicht in der Lage, die Zytokinproduktion von $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zu unterdrücken (IL-2: 9,6%; TNF: 44,2% und IFN- γ : 3,8%; bezogen auf die FoxP3 $^-$ Tresp-Zellen). Interessanterweise fand sich hier, anders als bei den Kulturen mit gemischten $CD4^+/CD8^+$ Tresp-Zellen, aber auch in den Ansätzen mit allogenen nTreg-Zellen eine relativ hohe Anzahl an TNF-Produzenten unter diesen Zellen (37,7%).

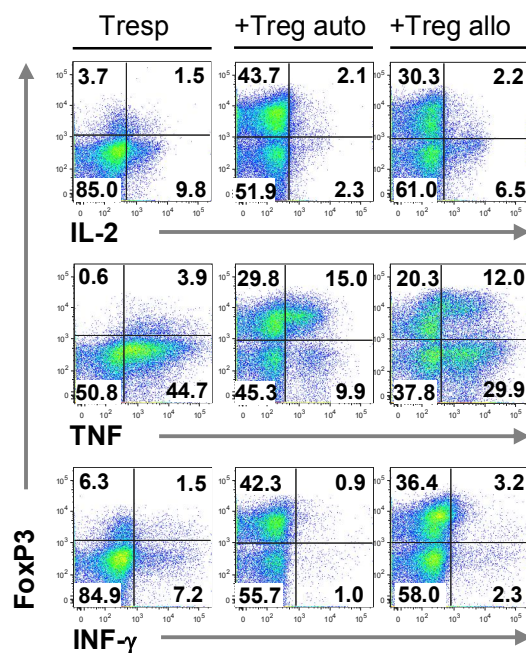


Abb. 3.15: Zytokinexpression von $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen in Kokultur mit autologen oder allogenen nTreg-Zellen. BALB/c ($CD90.1$) $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen wurden mit mixed APCs alleine (Tresp) oder zusammen mit autologen BALB/c (+Treg auto) bzw. allogenen C57BL/6 (+Treg allo) nTreg-Zellen stimuliert. Nach sechs Tagen Kokultur und vierstündiger PMA/Ionomycin Stimulation wurde ihre Zytokinexpression im FACS analysiert. Die Dotplots zeigen die Produktion von IL-2, TNF und IFN- γ in Foxp3 $^-$ Tresp- und FoxP3 $^+$ nTreg-Zellen. Dargestellt ist eines von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

3.3.4 Suppression der CD137 und CD134 Expression von Tresp-Zellen durch autologe nTreg-Zellen

Die beiden Mitglieder der TNF/TNFR Superfamilie CD137 (4-1BB) und CD134 (OX-40) werden u.a. auf T-Zellen exprimiert und geben nach Bindung an ihre Liganden kostimulatorische Signale an Tresp-Zellen ab (50, 51). Durch die Blockade dieser Signalwege konnte in Mäusen eine Reduktion der GvH-Reaktion erzielt werden (54, 159, 166).

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen gezeigt wurde, dass sowohl die Proliferation als auch die Zytokinexpression von Tresp-Zellen nur durch autologe nTreg-Zellen inhibiert wird, sollte im Folgenden die Wirkung der beiden unterschiedlichen nTreg-Populationen auf die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf Tresp-Zellen analysiert werden.

Dazu wurden BALB/c (CD90.1) Tresp-Zellen alleine oder mit autologen- (BALB/c) bzw. allogenen- (C57BL/6) nTreg-Zellen durch mixed APCs stimuliert. Nach sieben Tagen Kultur wurden die Zellen geerntet, für ihre Oberflächenmarker CD4, CD137 und CD134 bzw. intrazellulär für FoxP3 gefärbt und die Expression der einzelnen Marker im FACS gemessen. Als Kontrolle wurde die Expression von CD137 und CD134 auf kokultivierten T-Zellpopulationen zum Zeitpunkt 0 analysiert.

Wie in **Abb. 3.16 A** dargestellt, exprimieren frisch isolierte FoxP3⁻ Tresp-Zellen weder CD137 noch CD134. Unter den FoxP3⁺ nTreg-Zellen exprimieren dagegen etwa 18% CD137, und ca. 90% CD134, wobei nTreg-Zellen beider Stämme (BALB/c = +Treg auto; C57BL/6 = +Treg allo) diese kostimulatorischen Moleküle gleichermaßen exprimieren. Nach sieben Tagen allogener Stimulation exprimierten 29,3% der Tresp-Zellen CD137 und 53,6% CD134 (**Abb. 3.16 B**). In Gegenwart von autologen nTreg-Zellen war die Expression von beiden kostimulatorischen Molekülen auf den Tresp-Zellen stark supprimiert: 2,9% unter den Tresp-Zellen exprimierten CD137, 2,8% exprimierten CD134. Dagegen wurden in Anwesenheit von allogenen nTreg-Zellen 26,2% CD137- und 59,7% CD134-positive Tresp-Zellen gemessen. Bei autologen nTreg-Zellen veränderte sich die Expression von CD134 und CD137 nach sechstägiger MLR kaum, während unter den allogenen nTreg-Zellen 88,5% CD137 und 100% CD134 exprimierten. Somit lag die Expression beider kostimulatorischer Moleküle bei den nicht-suppressiven allogenen nTreg-Zellen wesentlich höher als bei den suppressiven autologen nTreg-Zellen.

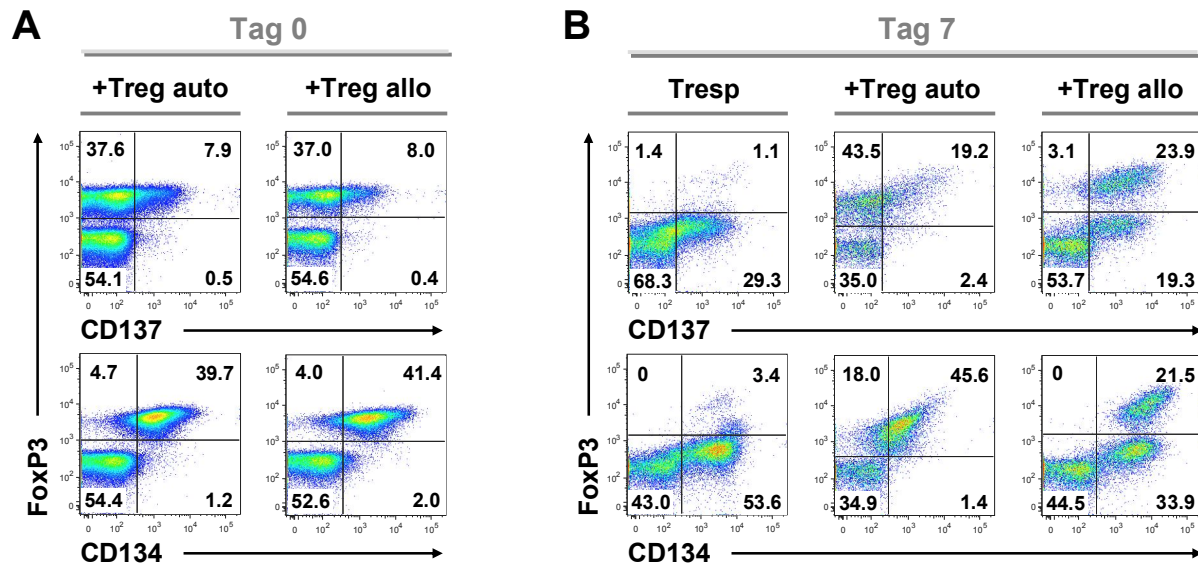


Abb. 3.16: Die Expression von CD137 (4-1BB) und CD134 (OX-40) auf kokultivierte Tresp- und nTreg-Zellen. Dargestellt ist die Expression von CD137 und CD134 auf CD4⁺CD25⁺ Tresp-Zellen (BALB/c CD90.1), die alleine (Tresp) oder in Anwesenheit von autologen (+Treg auto; BALB/c CD90.2) bzw. allogenen (+Treg allo; C57BL/6 H-2^b) nTreg-Zellen kultiviert wurden. Die Subpopulationen wurden in einer MLR für sieben Tage mit mixed APCs stimuliert. Anschließend wurden sie für ihre Oberflächenmarker CD4, CD137 und CD134, und intrazellulär für FoxP3 gefärbt und im FACS analysiert. Gezeigt ist die Expression (A) zum Zeitpunkt 0 oder (B) nach sieben Tagen Kokultur. Dargestellt ist eines von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Diese Beobachtungen zeigen, dass nur autologe nTreg-Zellen in der Lage sind, die Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD137 und CD134 auf Tresp-Zellen zu vermindern. Des Weiteren können allogene nTreg-Zellen trotz fehlender suppressiver Funktion ihren CD134 Phänotyp beibehalten und CD137 stark exprimieren, was auf ihre eigene Aktivierung hindeutet.

3.4 Protektive Wirkung autologer und allogener nTreg-Zellen im GvHD-Modell

nTreg-Zellen vermitteln nach allogener KMT einen Schutz vor GvHD, indem sie die Aktivierung und Expansion alloreaktiver nicht-regulatorischer Spender-T-Zellen (Tconv Zellen) unterdrücken. Die vorangegangenen *in vitro* Daten zeigten, dass nTreg-Zellen nur autologe Tresp-Zellen in ihrer Proliferation und Zytokinproduktion inhibieren. Folglich stellte sich die Frage, ob nur nTreg-Zellen des Effektorstamms oder auch nTreg-Zellen eines

Drittspenderstamms die Alloreaktivität der Tconv-Zellen unterdrücken und einen Schutz vor letaler GvHD bewirken. Deshalb sollte nun in einem haploidenten und einem komplett MHC-differenten KMT-Modell analysiert werden, ob auch für den protektiven *in vivo* Effekt nTreg- und Tconv-Zellen aus demselben Mausinzuchtstamm stammen müssen.

3.4.1 Schutz vor akuter GvHD durch nTreg-Zellen des Effektorstamms nach haploidenter KMT

In Studien von Hoffmann et al. (161) konnte gezeigt werden, dass BALB/c Empfängerermäuse, welche zuvor letal bestrahlt wurden und T-Zell-depletiertes Knochenmark der C57BL/6 Maus zur Rekonstitution erhielten, nach Transfer von C57BL/6 CD4⁺CD25⁻ konventioneller T-Zellen (Tconv-Zellen) an GvHD verstarben. Der adoptive Kotransfer von nTreg-Zellen des Spenderstamms C57BL/6, nicht aber des Empfängerstamms BALB/c, konnte die Tiere vor dieser letalen GvHD schützen.

Um zu verhindern, dass strahlungsresistente Empfängerzellen transplantierte Tconv- oder nTreg-Zellen abstoßen und um zu gewährleisten, dass nTreg-Zellen unterschiedlicher Herkunft alloren stimuliert werden, wurde ein F1-Transplantationmodell verwendet. Dabei wurden als Rezipienten CB6F1 Mäuse verwendet, die aus der F1-Generation der Kreuzung einer BALB/c mit einer C57BL/6 Maus entstanden sind und deshalb die MHC-Haplotypen beider Elternstämme auf ihren Zellen tragen (H-2^{bd}). Diese erhielten nach letaler Bestrahlung (1300 cGy TBI) ihr eigenes Knochenmark und T-Zellen eines der beiden Elternstämme. Diese T-Zellen können durch den Empfänger wegen bestehender Toleranz gegenüber ihren beiden Haplotypen (H-2^d oder H-2^b) nicht abgestoßen werden. Umgekehrt erkennen die Tconv-Zellen den jeweils anderen MHC-Haplotyp der Empfängerermäuse als fremd und werden dadurch aktiviert. In **Abb. 3.17** sind die unterschiedlichen Ansätze des F1-Transplantationsmodells dargestellt.

Letal bestrahlte CB6F1 Empfängerermäuse wurden mit 2×10^6 F1 Knochenmarkzellen rekonstituiert und bekamen gleichzeitig 1×10^6 CD4⁺CD25⁺ nTreg-Zellen aus BALB/c (H-2^d) oder C57BL/6 Mäusen (H-2^b) kotransplantiert. Zwei Tage nach Knochenmark- und nTreg-Gabe wurden entweder 1×10^6 CD4⁺/CD8⁺ (2:1) BALB/c (**A**) oder C57BL/6 (**B**) Tconv-Zellen in die Empfängerermäuse injiziert. Somit wurde gewährleistet, dass sowohl nTreg-Zellen als auch Tconv-Zellen einerseits nicht abgestoßen und andererseits durch die APCs des Empfängers in gleichem Maße aktiviert werden.

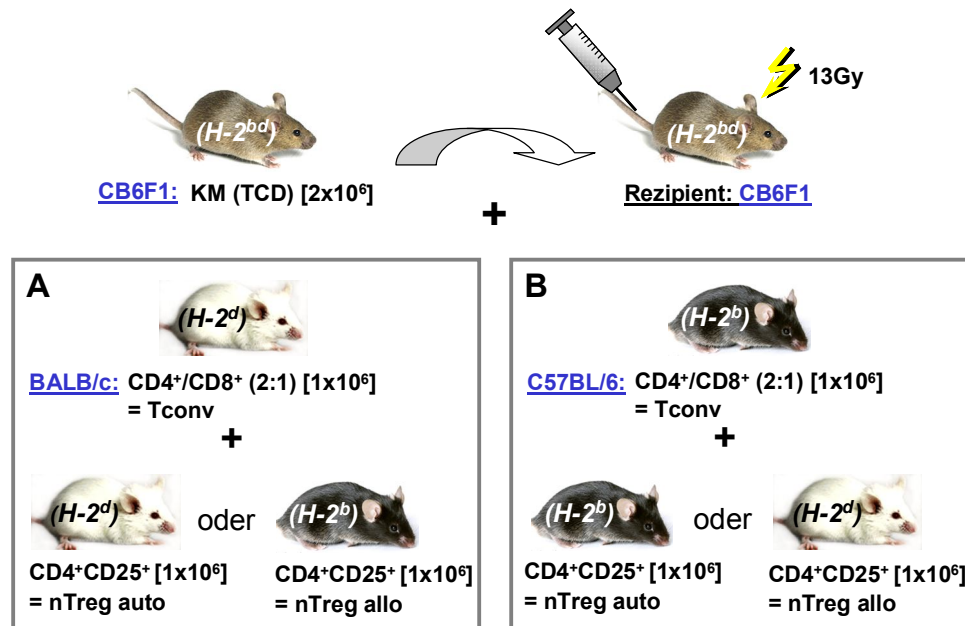


Abb. 3.17: F1-Transplantationsmodell. CB6F1 Mäuse wurden mit 1300 cGy letal bestrahlt und mit syngenen T-Zell-depletiertem (TCD) Knochenmark (2×10^6 Zellen) transplantiert. Als GvHD induzierende Tconv-Zellen wurden 1×10^6 CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen aus (A) BALB/c (H-2^d) oder (B) C57BL/6 (H-2^b) Mäusen im Verhältnis 2:1 injiziert und zusätzlich mit autologen (autolog zu den GvH-induzierenden Tconv-Zellen = nTreg auto) bzw. allogenen (allogen zu den GvH-induzierenden Tconv-Zellen = nTreg allo) nTreg-Zellen in gleicher Zahl kotransplantiert.

Für den Versuch wurden die Tiere in vier Gruppen eingeteilt (**Tabelle 3.1**). Mäuse, die nur ihr eigenes Knochenmark (KM-Gruppe), oder Knochenmark und CD4⁺/CD8⁺ Tconv-Zellen von einem der beiden Elternstämme erhielten (GvHD-Gruppe), wurden als Kontrollgruppen verwendet. Empfängermause von CB6F1 Knochenmarkzellen, Tconv-Zellen und autologen nTreg-Zellen (MHC-ident zu den transplantierten Tconv-Zellen) wurden als nTreg auto-Gruppe bezeichnet, solche die zusätzlich nTreg-Zellen des anderen Elternstamms erhielten (MHC-different zu den transplantierten Tconv-Zellen), wurden als nTreg allo-Gruppe bezeichnet.

Um den Krankheitsverlauf der GvH-Erkrankung zu ermitteln, wurde zweimal in der Woche das Gewicht und der klinische GvHD-Score ermittelt, der sich aus dem Bewertungsschema in Tab. 2.3 und dem Gewichtsverlauf der Tiere zusammensetzt (nach Cooke et al. (167), siehe Abschnitt 2.2.5.2). Zudem wurde täglich das Überleben der transplantierten Tiere überwacht. Empfängertiere wurden nach Erreichen eines klinischen Scores von 6, oder nach einem maximalen Beobachtungszeitraum von 100 Tagen getötet und auf zellulärer Zusammensetzung durchflußzytometrisch analysiert. Zusätzlich wurden Zielorgane der GvHD wie Haut, Darm und Leber auf pathologische Auffälligkeiten hin untersucht.

Gruppe	Knochenmark	Tconv-Zellen (CD4 ⁺ /CD8 ⁺)	nTreg auto-Zellen (CD4 ⁺ CD25 ⁺)	nTreg allo-Zellen (CD4 ⁺ CD25 ⁺)
KM-Gruppe	+	-	-	-
GvHD-Gruppe	+	+	-	-
nTreg auto-Gruppe	+	+	+	-
nTreg allo-Gruppe	+	+	-	+

Tabelle. 3.1: Gruppeneinteilung im F1-Transplantationsmodell. Unterteilung der Mäuse in unterschiedliche Transplantationsgruppen. Mäuse der KM-Gruppe erhielten nur syngenes Knochenmark, während Tieren der GvHD-Gruppe zusätzlich CD4⁺/CD8⁺ (2:1) Tconv-Zellen kotransplantiert wurden. Mäusen der nTreg auto-Gruppe wurden Knochenmark, Tconv-Zellen und nTreg-Zellen desselben Elternstamms injiziert. Tiere der nTreg allo-Gruppe enthielten Knochenmark und Tconv-Zellen des einen Elternstamms sowie zusätzlich nTreg-Zellen des anderen Elternstamms.

3.4.1.1 Wirkung kotransferierter autologer bzw. allogener nTreg-Zellen auf den Grad der Erkrankung und das Überleben der Tiere nach haploidenter KMT

Abb. 3.18 zeigt den Gewichtsverlauf, den klinischen Score und das Überleben der Mäuse nach Transplantation von BALB/c Tconv-Zellen. Mäuse der KM-Gruppe blieben erwartungsgemäß gesund und überlebten den Beobachtungszeitraum von 100 Tagen. Dagegen zeigten Tiere der GvHD-Gruppe starke Anzeichen einer GvH-Erkrankung. Sie verloren innerhalb von vier Wochen stark an Gewicht, entwickelten einen hohen GvHD-Index und verstarben alle innerhalb von 44 Tagen. Wie erwartet, waren die Tiere die zusätzlich nTreg-Zellen der BALB/c Maus erhalten hatten, vor letaler GvHD geschützt. Sie zeigten einen ähnlichen Gewichtsverlauf und klinischen Score wie die KM-Gruppe und alle Tiere überlebten den Beobachtungszeitraum. In der ersten Woche war sowohl in der KM-Kontrollgruppe als auch in der durch autologe nTreg-Zellen geschützten Behandlungsgruppe ein leichter Anstieg des GvHD-Scores zu erkennen (KM-Gruppe: 0,3; nTreg auto-Gruppe: 0,6), der durch den in den Score einfließenden Gewichtsverlust nach Bestrahlung zustande kam. Nach etwa 10 Tagen normalisierte sich das Gewicht und somit der GvH-Index. Im Gegensatz zur nTreg auto-Gruppe verloren Mäuse der nTreg allo-Gruppe, ähnlich wie die GvHD-Gruppe, stetig an Gewicht und entwickelten klinische Zeichen einer GvHD. Neun der 10 Tiere verstarben innerhalb von 44 Tagen an der akuten GvH-Erkrankung. Lediglich ein Tier erholte sich von dem Gewichtsverlust und den GvHD-Anzeichen (**Abb. 3.18 B/C**). Das Überleben der Tiere, die BALB/c Tconv- und autologe nTreg-Zellen bekamen, unterschied sich signifikant vom Überleben der Mäuse, denen BALB/c Tconv- und allogene (C57BL/6) nTreg-Zellen transplantiert wurden ($p < 0,001$).

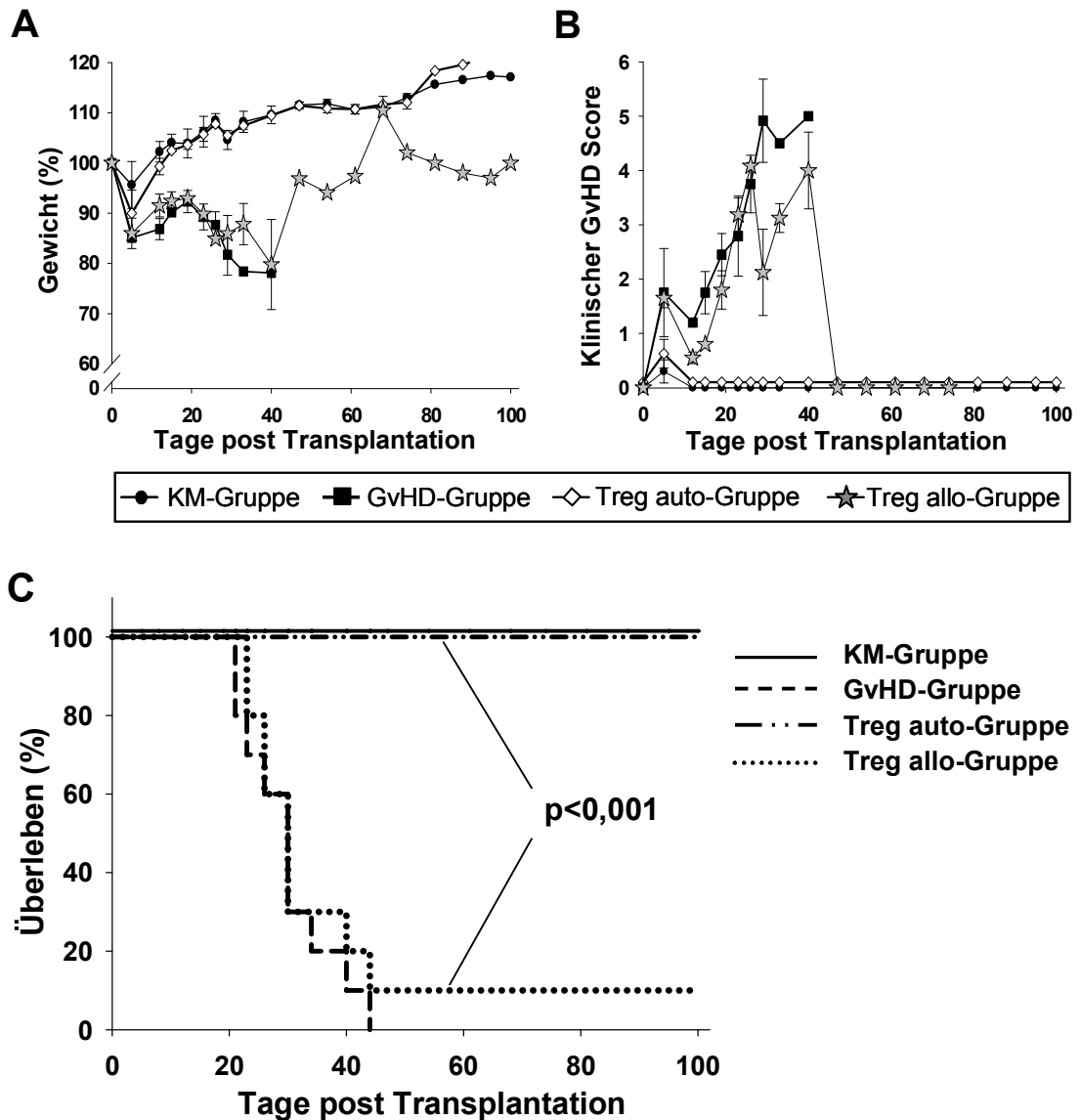


Abb. 3.18: Dargestellt ist (A) das Gewicht, (B) der klinische GvHD-Score und (C) das Überleben von CB6F1 Mäusen nach haploidenter Transplantation. CB6F1 Rezipienten wurden letal bestrahlt (1300cGy) und erhielten 2×10^6 syngene Knochenmarkszellen (●). Parallelgruppen erhielten zusätzlich 1×10^6 $CD4^+/CD8^+$ (2:1) BALB/c Tconv-Zellen (■) und 1×10^6 autologe (BALB/c; ◇) bzw. allogene (C57BL/6; ★) nTreg-Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit insgesamt 10 Tieren pro Gruppe. Der Unterschied hinsichtlich des Überlebens der Tiere der Treg auto- und Treg allo-Gruppe ist statistisch signifikant ($p < 0,001$; nach Kaplan Meier).

Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn Tconv-Zellen statt aus BALB/c aus C57BL/6 Tieren gewonnen wurden (**Abb. 3.19**). Mäuse der KM-Gruppe blieben gesund und überlebten den Beobachtungszeitraum von 100 Tagen. Alle Tiere der GvHD-Gruppe zeigten dagegen einen deutlichen Gewichtsverlust, einen hohen GvHD-Score und verstarben innerhalb von 56 Tagen an akuter GvHD. Im Gegensatz dazu konnten in Tieren der nTreg

auto-Gruppe keine Anzeichen einer GvH-Reaktion beobachtet werden. Der 10%ige Gewichtsverlust und leichte Anstieg des klinischen Scores in der ersten Woche konnte auch hier auf Darmschädigungen aufgrund der vorausgegangenen letalen Bestrahlung zurückgeführt werden und alle Tiere überlebten für mindestens 100 Tage. Das Bild der nTreg allo-Gruppe war heterogen: 60% der Mäuse verloren stetig an Gewicht, entwickelten rasch einen hohen klinischen GvHD-Score und verstarben innerhalb von 40 Tagen. Von den restlichen vier Tieren zeigte eines klinische Anzeichen einer GvHD: es kam zu einem 20%igen Gewichtsverlust und der GvHD-Score erreichte einen Wert von 5. Die restlichen drei Tiere entwickelten keine GvHD und überlebten bis Tag 100 weitgehend symptomfrei.

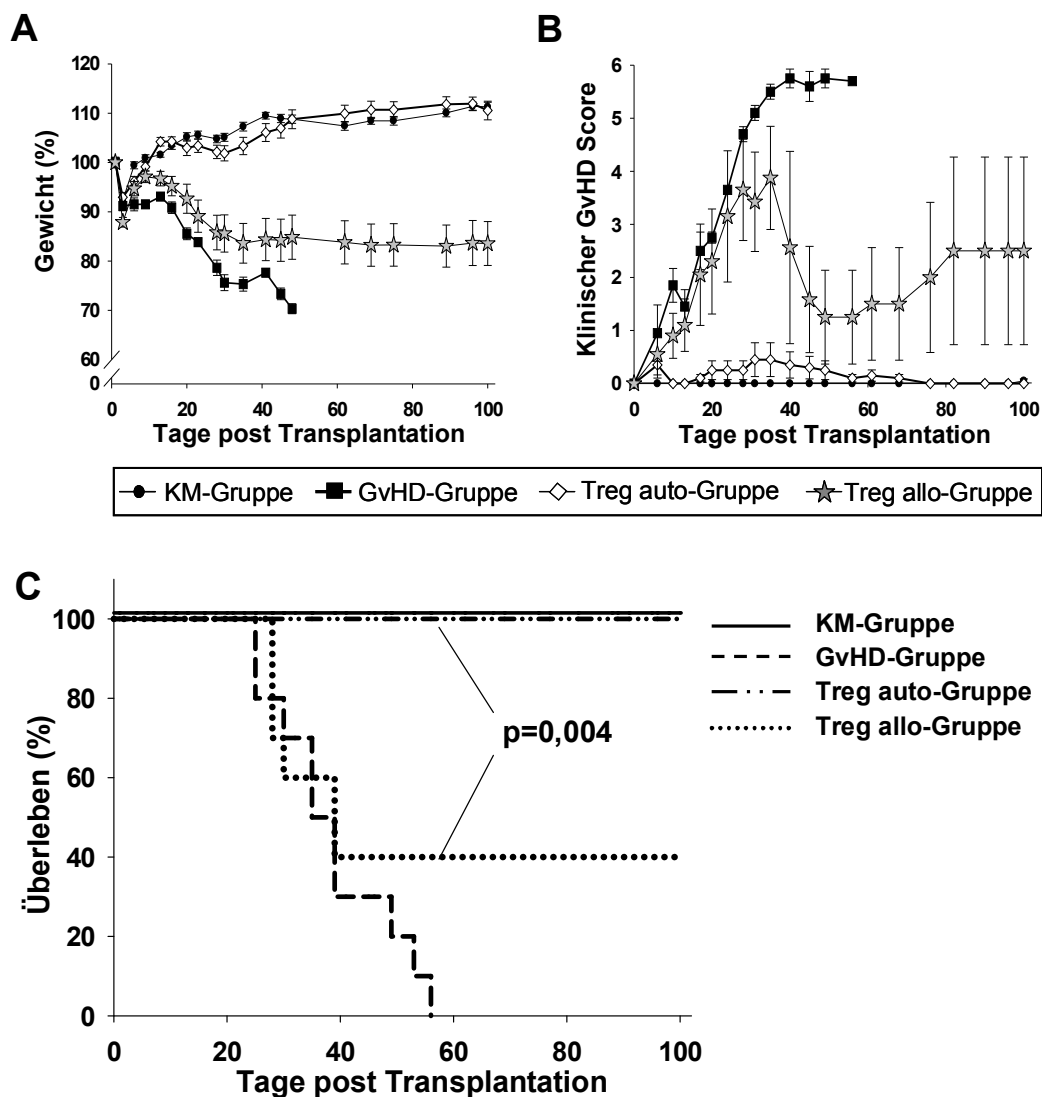


Abb. 3.19: (A) Gewicht, (B) klinischer GvHD-Score und (C) Überleben von CB6F1 Rezipienten nach haploidenter Knochenmarktransplantation. CB6F1 Mäuse wurden nach letaler Bestrahlung (TBI; 1300 cGy) 2×10^6 syngene Knochenmarkszellen alleine (●), oder zusammen mit 1×10^6 $CD4^+/CD8^+$ (2:1) C57BL/6 Tconv-Zellen (■) und zusätzlich 1×10^6 autologen (C57BL/6; ◇) bzw. allogenen (BALB/c; ☆) nTreg-Zellen transplantiert. Gezeigt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit insgesamt 10 Tieren pro Gruppe. Der Unterschied hinsichtlich des Überlebens der Tiere der Treg auto- und Treg allo-Gruppe ist statistisch signifikant ($p < 0,001$; nach Kaplan Meier).

Durch diesen Versuch wurde gezeigt, dass nach Kotransplantation von autologen nTreg-Zellen ein 100%iger Schutz vor akuter GvHD besteht, während allogene nTreg-Zellen nur zu 30% vor letaler GvHD schützen. Dieser Unterschied im Überleben war statistisch signifikant ($p=0,004$).

Somit ließ sich in beiden Versuchansätzen zeigen, dass nur nTreg-Zellen des GvH-induzierenden Spenderstamms einen vollständigen Schutz vor GvHD vermitteln. Prinzipiell können nTreg-Zellen beider Spenderstämme GvHD inhibieren, wie durch Variation der GvHD-auslösenden T-Zellpopulationen bewiesen. Im Unterschied hierzu zeigen nTreg-Zellen des MHC-differenten Elternstamms entweder keinen, oder nur einen signifikant verminderten Schutz vor GvHD.

3.4.1.2 Histopathologische Veränderungen

Histopathologische Untersuchungen der GvHD-Zielorgane Leber, Darm und Haut sollten Aufschluss über den Schweregrad der Erkrankung bzw. das Ausmaß des Schutzes vor GvHD von Tieren der KM-, GvHD-, nTreg auto- und nTreg allo-Gruppen geben.

Dafür wurden die Organe erkrankter Tiere am Tag ihrer Euthanasie entnommen und in Formalin fixiert. Die Organe gesunder Tiere wurden nach Versuchsende (Tag 100) aufgearbeitet. Anschließend wurden Paraffinschnitte angefertigt, mit HE gefärbt und mikroskopisch analysiert. Die Gewebeschnitte wurden auf einer Skala von 0 bis 4 bewertet. Der histopathologische Score wurde verblindet durch einen Mitarbeiter der Pathologie Regensburg (Dr. Thomas Schubert; seit 2008 in Frankfurt) ermittelt.

In **Abb. 3.20** ist der histopathologische Score der Versuchsgruppen dargestellt, denen entweder GvHD-induzierende C57BL/6 (**A**) oder BALB/c (**B**) Tconv-Zellen transplantiert wurden. Weder in Darm, noch in der Haut oder Leber konnten in Mäusen der KM- und nTreg auto-Gruppe beider Ansätze histopathologische Besonderheiten festgestellt werden. Der Schutz dieser Tiere spiegelt sich somit nicht nur im Überleben (Abb. 3.18 und 3.19), sondern auch in den histologischen Analysen wider. Dagegen konnte in Tieren der GvHD- und nTreg allo-Gruppe, denen C57BL/6 Tconv-Zellen transplantiert wurden, in allen drei Zielorganen histopathologische Auffälligkeiten festgestellt werden (**Abb. 3.20 A**).

Abb. 3.20 B zeigt, dass in der Leber von Tieren der GvHD- und nTreg allo-Gruppen, denen BALB/c Tconv-Zellen transplantiert wurden, keine histopathologischen Auffälligkeiten festgestellt werden konnte. Auch in der Haut konnten nur vergleichsweise milde Veränderungen beobachtet werden. Es zeigten sich aber deutliche Zeichen der Darm-GvHD in beiden Gruppen, während Tiere nach Transplantation von autologen nTreg-Zellen keine histologischen Zeichen der GvHD aufwiesen.

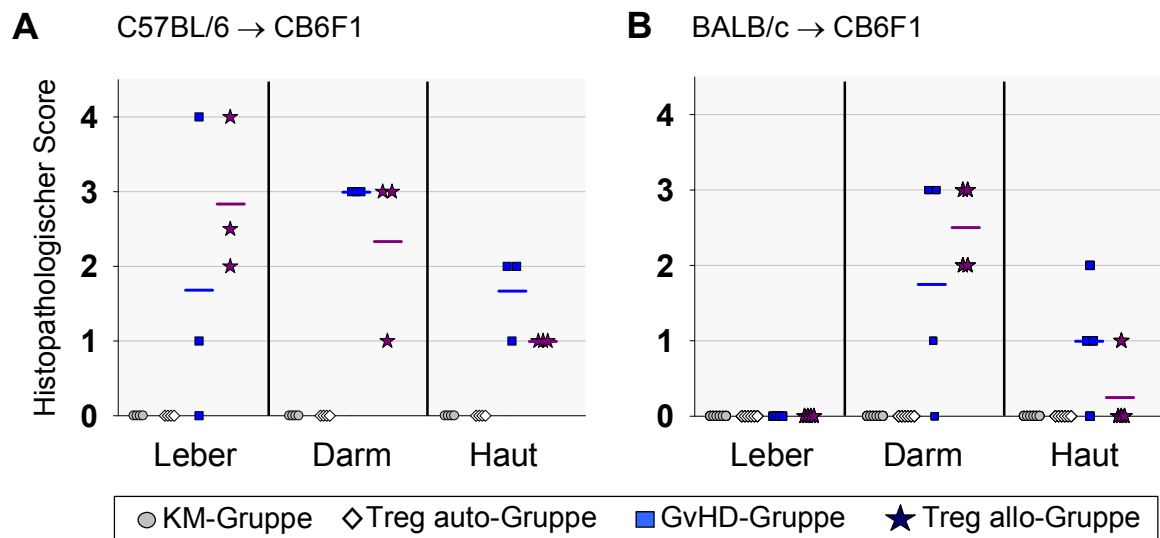


Abb. 3.20: Histopathologischer Score von Leber, Darm und Haut. CB6F1 Rezipienten der KM-, nTreg auto-, GvHD- und nTreg allo-Gruppe wurden GvHD-induzierende Tconv-Zellen der C57BL/6 (A) oder BALB/c (B) Maus transplantiert. Der Score wurde verblindet durch eine unabhängige Mitarbeiter der Pathologie Regensburg (Dr. Thomas Schubert) ermittelt und auf einer Skala von 0 bis 4 gewertet, wobei Grad 4 schwerwiegendste Veränderungen im zerstörten Gewebe während einer GvH-Erkrankung beschreibt. Die Graduierung erfolgte an gefärbten HE-Schnitten nach Grass et al. und Hill et al. (152, 168). Die Organe gesunder Tiere wurden nach Versuchsende (Tag 100), GvHD-erkrankter Tiere am Tag ihrer Euthanasie entnommen. Die einzelnen Symbole stellen jeweils ein Tier dar, mit (A) 3-4 bzw. (B) 4-6 Mäusen pro Gruppe.

In **Abb. 3.21** sind repräsentative Schnitte der Leber und des Darms von F1 Rezipienten der KM-, nTreg auto-, nTreg allo- und GvHD-Gruppen dargestellt, denen C57BL/6 Tconv-Zellen transplantiert wurden. In Mäusen der KM- und nTreg auto-Gruppen konnten keine histologischen Auffälligkeiten in den beiden GvHD Zielorganen festgestellt werden. Die Leber zeigt ein unauffälliges Portalfeld und Leberparenchym. Im Darm (Kolon) wurden parallel angeordnete Krypten und ein regelhafter Zellgehalt in der *Tunica propria* ohne floride Infiltrate detektiert.

Tiere der GvHD- und nTreg allo-Gruppe zeigten dagegen starke krankhafte Veränderungen in beiden Organen. In der Leber konnte ein deutlich erhöhter Zellgehalt im Portalfeld festgestellt werden, der sich vorwiegend aus Lymphozyten und vereinzelt neutrophilen Granulozyten zusammen setzt. Die Lymphozyten griffen aus den Gallengängen über, was zu einer zunehmenden Epitheldestruktion und letztendlich zur Rarefizierung der Gallengänge führte. Im angrenzenden Parenchym konnten außerdem Einzelzellnekrosen von Hepatozyten detektiert werden. Im Darm konnte eine Rarefizierung bzw. unregelmäßige Architektur der Krypten festgestellt werden. Zudem wurde eine relativ zellarme Bindegewebsvermehrung in der *Tunica propria* und zahlreiche Einzelzellapoptosen in der Kryptenbasis beobachtet.

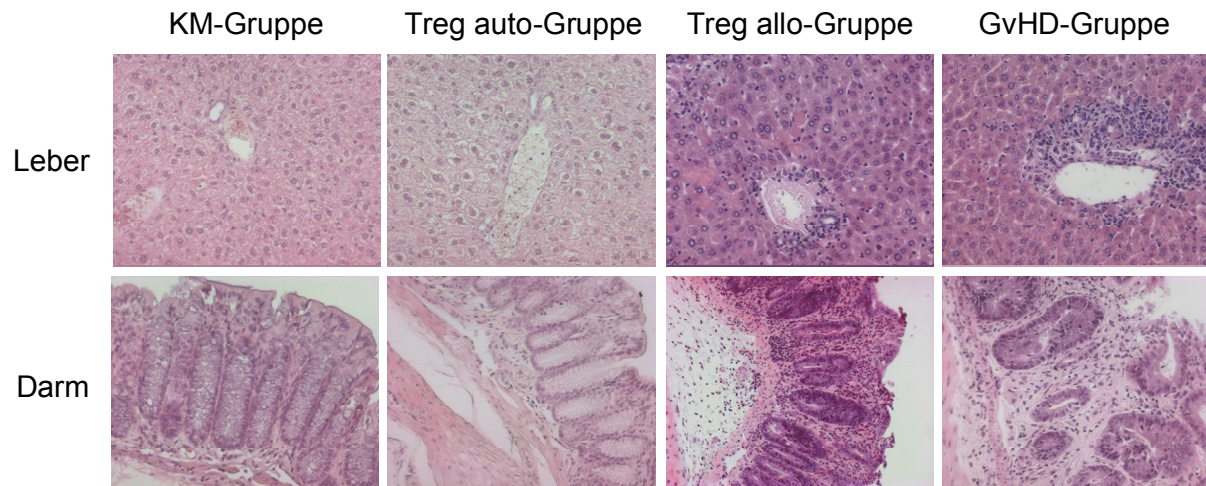


Abb. 3.21: Histologie von Leber und Darm unterschiedlich transplantiert F1 Empfängertiere. Dargestellt ist jeweils ein HE-Gewebeschnitt von F1 Rezipienten der KM-, nTreg auto-, nTreg allo- und GvHD- Gruppen, denen C57BL/6 Tconv-Zellen transplantiert wurden. Gezeigt sind die Gewebeschnitte von Mäusen der GvHD- und nTreg allo-Gruppen mit einem histologischen Score von 3. Die Organe gesunder Tiere wurden nach Versuchsende (Tag 100), GvHD-erkrankter Tiere am Tag ihrer Euthanasie entnommen. 200fache Vergrößerung der Leber und 100fache Vergrößerung des Darms.

Somit ergaben auch die histopathologischen Untersuchungen signifikante Unterschiede zwischen Tieren der nTreg auto- und nTreg allo-Gruppe. Der adaptive Transfer allogener nTreg-Zellen konnte die Entwicklung einer GvH-Reaktion in den untersuchten Organen nicht verhindern, während Tiere nach Kotransplantation von autologen nTreg-Zellen histologisch keine GvHD-Zeichen zeigten.

3.4.1.3 Zelluläre Zusammensetzung von Milz und Knochenmark in gesunden und GvHD erkrankten CB6F1 Rezipienten

Wie in der Einleitung beschrieben, kommt es während der GvH-Reaktion zu starken zellulären Veränderung, wie z.B. einer B-Zell-Defizienz und der Expansion von CTLs (150, 169). Deshalb wurde als nächstes die Zusammensetzung der lymphoiden Zellen in Milz und Knochenmark unterschiedlich transplantiert Mäuse untersucht. Hierdurch sollten weitere Aufschlüsse über den unterschiedlichen suppressiven Effekt von autologen und allogenen nTreg-Zellen erhalten werden.

Zu diesem Zweck wurden Milz und Knochenmark der Mäuse zum Zeitpunkt ihres GvHD bedingten Todes (GvHD- und nTreg allo-Gruppe), oder am Ende des Beobachtungszeitraums an Tag 100 (KM- und nTreg auto-Gruppe) entnommen.

Anschließend wurden Milz- und Knochenmarkszellen aus den Organen isoliert und mit den Antikörpern für CD19 (B-Zellen), CD11b und Gr-1 (Monozyten und Granulozyten), TCR β sowie CD4 und CD8 (T-Zellsubpopulationen) gefärbt. Zur Unterscheidung von Spender- und Empfängerzellen wurden zusätzlich Antikörper gegen die MHC-Moleküle H-2K^b und H-2K^d eingesetzt.

Abb. 3.22 zeigt die Gesamtzellzahlen von Milz und Knochenmark haploident transplantierten Tiere. Als Kontrollen dienten unbehandelte Tiere der Spender- (**A**, BALB/c oder **B**, C57BL/6) und des Empfängerstamms (CB6F1). Tiere der beiden nTreg auto-Gruppen wiesen eine ähnliche Menge an Milz- und Knochenmarkszellen auf, wie die Tiere der entsprechenden KM-Kontrollgruppen. In Tieren denen BALB/c (**A**) Tconv-Zellen transplantiert wurden, konnte für die KM- und nTreg auto-Gruppe im Vergleich zu unbehandelten Tieren, eine doppelte Anzahl an Splenozyten gemessen werden, während im Knochenmark fast keine Unterschiede detektiert wurden. Tiere der GvHD- und der nTreg allo-Gruppe zeigten im Gegensatz dazu eine starke Reduktion der Gesamtzellzahl sowohl in der Milz als auch im Knochenmark. Ein ähnliches Bild zeigte sich, wenn den F1 Empfängermäusen Tconv-Zellen der C57BL/6 Maus transplantiert wurden (**B**).

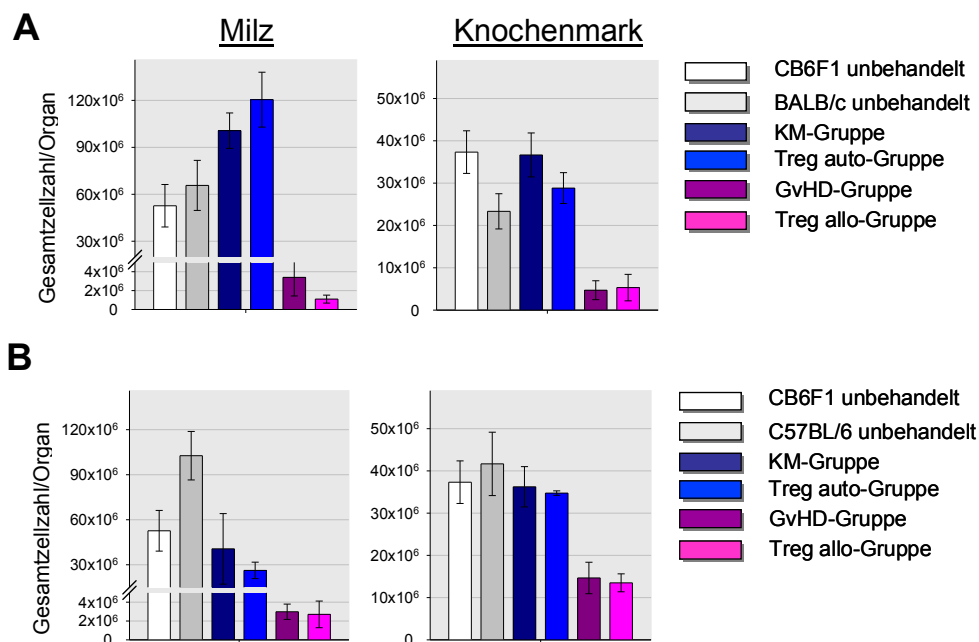


Abb. 3.22: Gesamtzellzahl in Milz und Knochenmark von unterschiedlich transplantierten F1 Empfängertieren: KM-Gruppe: dunkelblaue Balken, GvHD-Gruppe: dunkelrote Balken, nTreg auto-Gruppe: blaue Balken und nTreg allo-Gruppe: pinke Balken. GvHD induzierende Tconv-Zellen wurden aus (**A**) BALB/c bzw. (**B**) C57BL/6 Mäusen isoliert. Zum Vergleich wurden Milz und Knochenmark (Zellen aus zwei Hinterläufen) von unbehandelten Spender- (**A**: BALB/c; **B**: C57BL/6) bzw. Empfängertieren (CB6F1) analysiert. Tiere der KM- bzw. nTreg auto-Gruppe wurden an Tag 100 analysiert. Alle hier berücksichtigten Tiere der GvHD- und nTreg allo-Gruppen verstarben an akuter GvHD zwischen Tag 21 und Tag 56 nach KMT und wurden zum jeweiligen Zeitpunkt analysiert. Es wurden (**A**) 3 bis 7 bzw. (**B**) 3 bis 6 Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten, und jeweils 3 unbehandelte Mäuse analysiert.

Abb. 3.23 zeigt die zelluläre Zusammensetzung von unbehandelten Tieren und Rezipienten, denen Tconv-Zellen der BALB/c Maus transplantiert wurden.

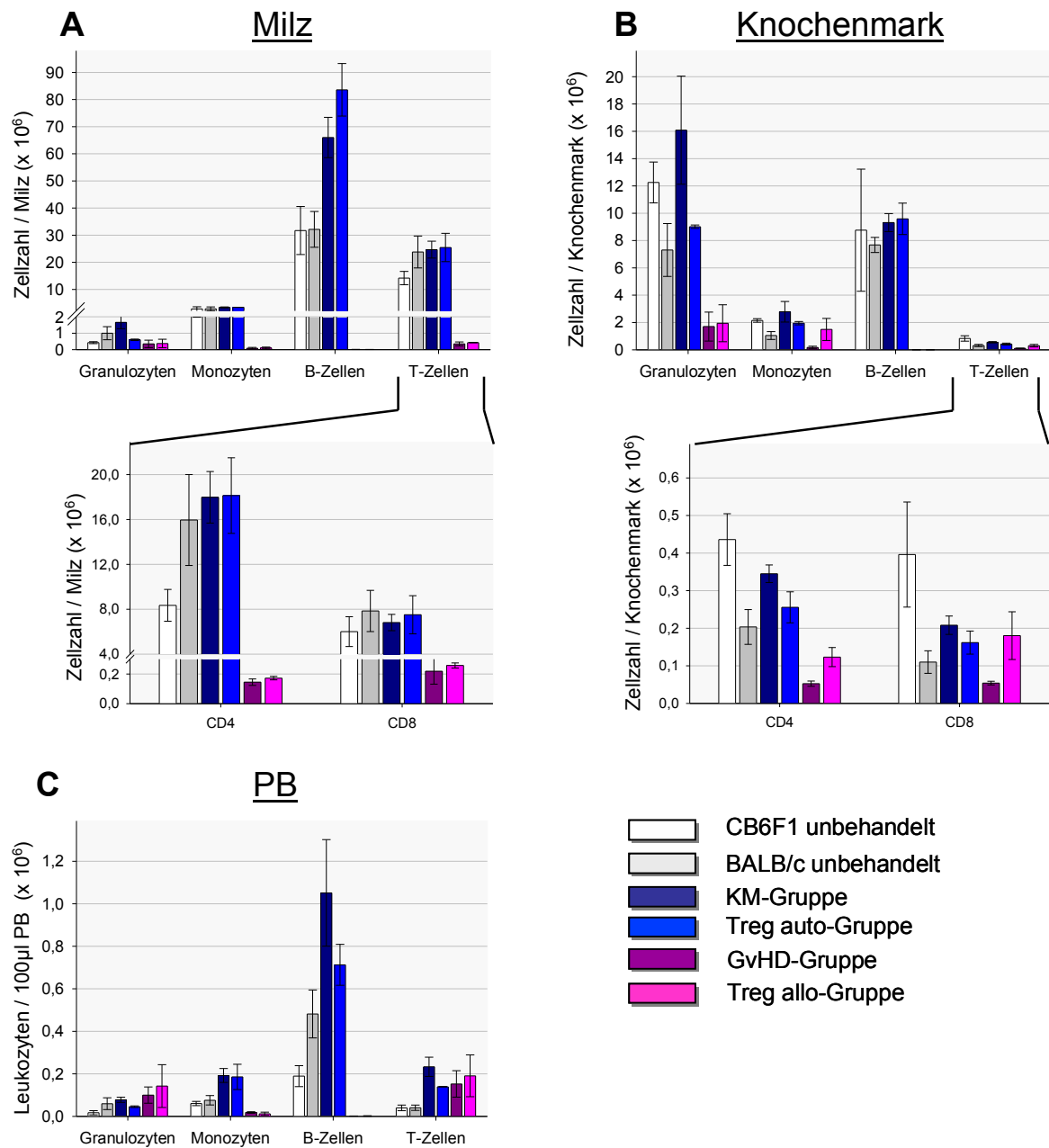


Abb. 3.23: Zellanalysen von (A) Milz, (B) Knochenmark und (C) peripherem Blut (PB) (Anzahl der Zellen pro 100 μ l) von unterschiedlich transplantierten F1 Empfängertieren: KM-Gruppe: dunkelblaue Balken, GvHD-Gruppe: dunkelrote Balken, nTreg auto-Gruppe: blaue Balken und nTreg allo-Gruppe: pinke Balken. GvHD induzierende Tconv-Zellen wurden aus BALB/c Mäusen isoliert. Gezeigt ist die Anzahl an Granulozyten, Monozyten, B- und T-Zellen. T-Lymphozyten wurden in der Milz und im Knochenmark in CD4 und CD8 T-Zellen unterteilt. Zum Vergleich wurden Milz und Knochenmark (Zellen aus zwei Hinterläufen) von unbehandelten Spender- (BALB/c) bzw. Empfängertieren (CB6F1) analysiert. Tiere der KM- bzw. nTreg auto-Gruppe wurden an Tag 100 analysiert. Alle analysierten Tiere der GvHD- und nTreg allo-Gruppen verstarben an akuter GvHD zwischen Tag 21 und Tag 44 nach KMT. Es wurden 3 bis 7 Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten, und jeweils 3 unbehandelte Mäuse analysiert.

In allen Tieren der KM- und nTreg auto-Gruppen konnte eine ähnliche Zusammensetzung aus Granulozyten, Monozyten, B- und T-Zellen in Milz (**Abb. 3.23 A**) und Knochenmark (**Abb. 3.23 B**) festgestellt werden. Die gegenüber den Kontrolltieren erhöhte Splenozytenzahl in Empfängertieren der KM- und nTreg auto-Gruppe beruhte überwiegend auf einer erhöhten Anzahl $CD19^+$ B-Zellen. Dagegen stellte die fehlende B-Zell-Rekonstitution sowohl in der Milz als auch im Knochenmark ein typisches Merkmal in GvHD erkrankten Mäusen dar. Interessanterweise zeigten auch Tiere der nTreg allo-Gruppe eine solche Defizienz im B-Zellkompartiment. Darüber hinaus konnte in unbehandelten Tieren und gesunden Versuchstieren (KM- bzw. nTreg auto-Gruppe) unter den T-Lymphozyten ein normales Verhältnis von CD4 zu CD8 T-Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde neben der stark verringerten T-Zellzahl in GvHD erkrankten Rezipienten (GvHD- bzw. nTreg allo-Gruppe), eine Verschiebung des CD4 zu CD8 Verhältnisses in Richtung $CD8^+$ T-Lymphozyten beobachtet. Trotz sehr geringer Splenozytenzahl von GvHD erkrankten Mäusen konnte im peripheren Blut (**Abb. 3.23 C**) eine vergleichbare Anzahl an T-Zellen in allen transplantierten Tieren beobachtet werden, die allerdings wesentlich höher lag als in unbehandelten Tieren.

In allen erkrankten Tieren der GvHD- und nTreg allo-Gruppen konnte ein kompletter Donorchimärismus der T-Lymphozyten (BALB/c) nachgewiesen werden. Mäuse der nTreg auto-Gruppe wiesen nach 100 Tagen Beobachtungszeitraum zu etwa 90% neu rekonstituierte CB6F1 T-Lymphozyten auf. Restliche BALB/c Spenderlymphozyten, unter denen vor allem $CD8^+$ T-Zellen zu finden waren, konnten hauptsächlich in der Milz und der Peripherie nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Ähnliche zelluläre Unterschiede in Milz und Knochenmark wurden beobachtet, wenn C57BL/6 Tconv-Zellen verwendet wurden (**Abb. 3.24**). Tiere der KM- und nTreg auto-Gruppe wiesen sowohl quantitativ als auch hinsichtlich der einzelnen Zellpopulationen eine ähnliche Zusammensetzung wie unbehandelte Empfänger- und Spendertiere auf. Dies lässt sich durch eine funktionierende Hämatopoese begründen. In Tieren der GvHD- und nTreg allo-Gruppen konnten weder in Milz noch im Knochenmark B-Zellen detektiert werden. T-Lymphozyten dieser beiden Gruppen wiesen einen kompletten Donorchimärismus auf. Sowohl in der Milz als auch im Knochenmark konnte, im Gegensatz zu den Ansätzen mit BALB/c Tconv-Zellen, eine hohe Menge an Granulozyten gemessen werden, was auf eine suffiziente Rekonstitution der Myelopoese hinweist.

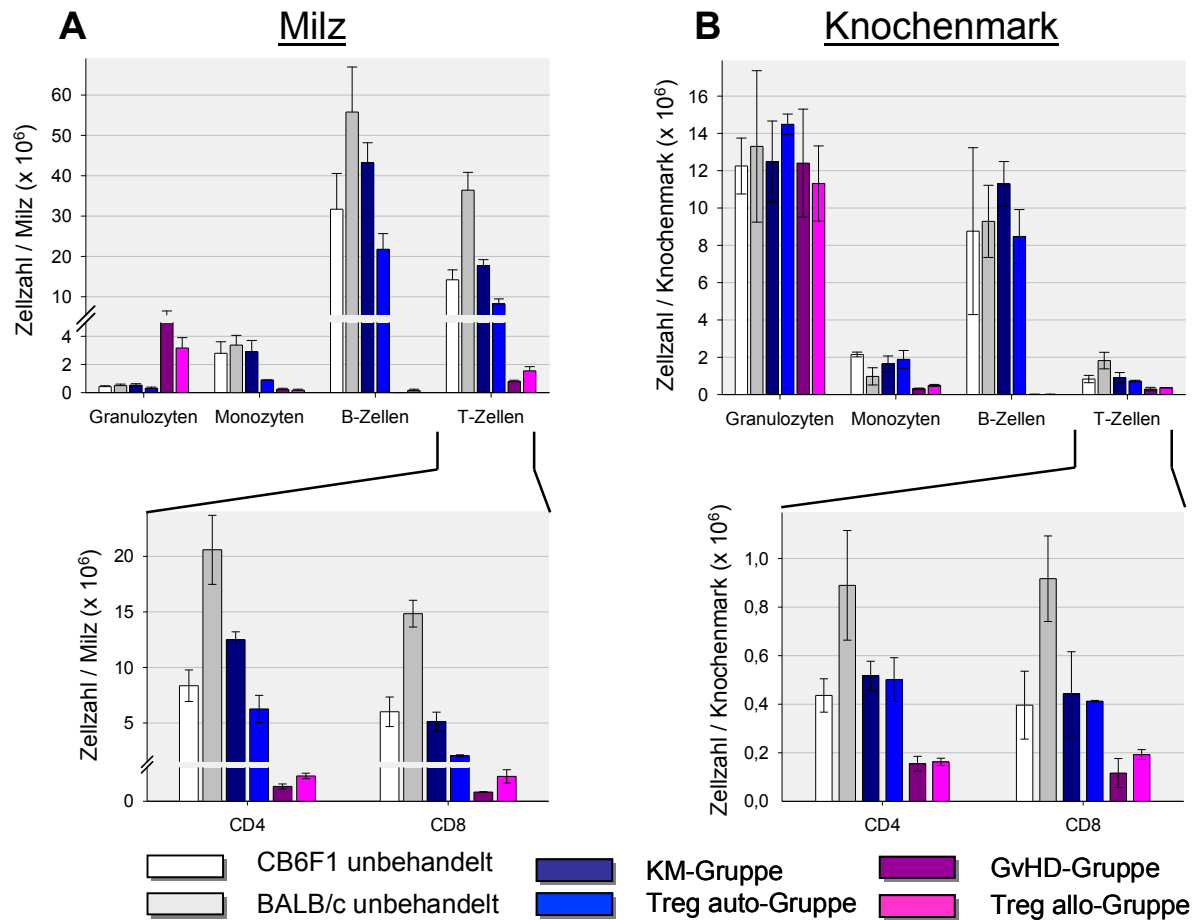


Abb. 3.24: Zellanalysen von (A) Milz und (B) Knochenmark von unterschiedlich transplantierten F1 Empfänger-tieren: KM-Gruppe: dunkelblaue Balken, GvHD-Gruppe: dunkelrote Balken, nTreg auto-Gruppe: blaue Balken und nTreg allo-Gruppe: pinke Balken. GvHD induzierende Tconv-Zellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert. Gezeigt ist die Anzahl an Granulozyten, Monozyten, B- und T-Zellen. T-Lymphozyten wurden in der Milz und im Knochenmark in CD4 und CD8 T-Zellen unterteilt. Zum Vergleich wurden Milz und Knochenmark (Zellen aus zwei Hinterläufen) von unbehandelten Spender- (BALB/c) bzw. Empfänger-tieren (CB6F1) analysiert. Tiere der KM- bzw. nTreg auto-Gruppe wurden an Tag 100 analysiert. Alle analysierten Tiere der GvHD- und nTreg allo-Gruppen verstarben an akuter GvHD zwischen Tag 28 und Tag 56 nach KMT. Es wurden 3 bis 6 Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten, und jeweils 3 unbehandelte Mäuse analysiert.

Eine vergleichbare Gesamtzellzahl und eine fast identische zelluläre Zusammensetzung in Milz und Knochenmark in Tieren der nTreg auto- und der KM-Kontrollgruppe, deuten auf eine funktionierende Hämatopoese und einen Schutz vor akuter GvHD hin. Im Gegensatz dazu konnte in Tieren der nTreg allo-Gruppe eine Zerstörung der lymphatischen Organe mit konsekutiver Zytopenie und eine stark verminderte Hämatopoese beobachtet werden.

3.4.2 nTreg-Zellen eines Drittspenderstamms bieten keinen Schutz vor letaler GvHD

Im vorangegangenen F1-Transplantationsmodell wurde gezeigt, dass Tconv-Zellen nur durch den adoptiven Transfer von autologen nTreg-Zellen inhibiert werden und dadurch ein Schutz vor GvHD in den Empfängerermäusen entsteht. Als nächstes stellte sich die Frage, ob auch in einem allogenen KMT-Modell nur durch nTreg-Zellen des Knochenmark-Spenderstamms Alloreaktivität unterdrückt wird, oder ob auch nTreg-Zellen eines Drittspenderstamms vor letaler GvHD schützen. Hierzu erhielten Empfängerermäuse nach Konditionierung allogene Knochenmark- und Tconv-Zellen. Zusätzlich wurden nTreg-Zellen des Knochenmark-Spenderstamms bzw. nTreg-Zellen eines MHC-differenten Drittspenderstamms kotransplantiert.

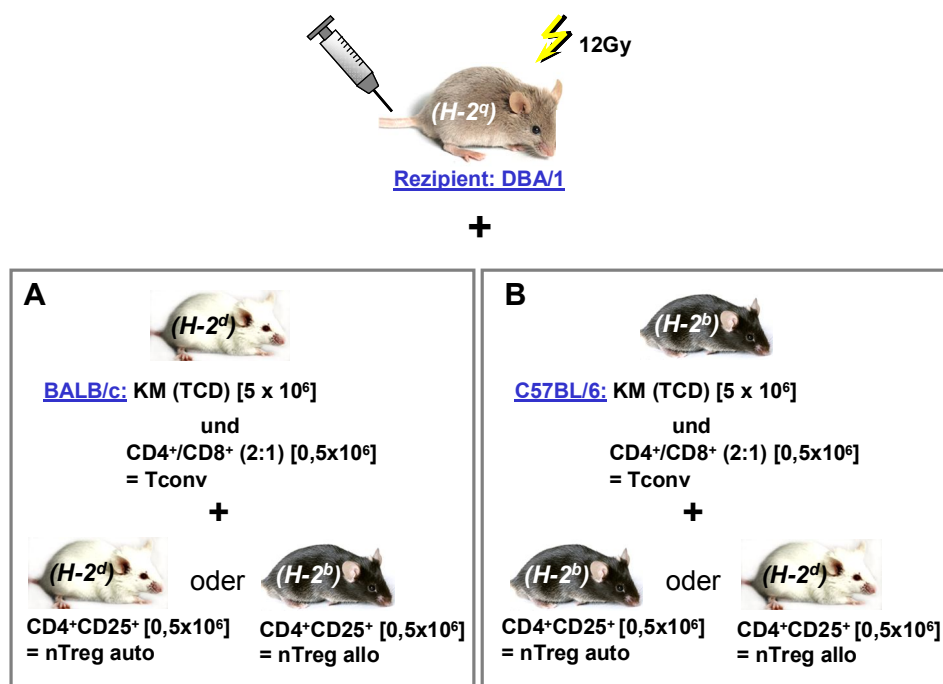


Abb. 3.25: Allogenes KMT-Modell. DBA/1 (H-2^a) Empfängerermäuse wurden letal bestrahlt (1200 cGy) und mit 5 x 10⁶ allogenen Knochenmarkszellen (KM) von (A) BALB/c (H-2^d) oder (B) C57BL/6 (H-2^b) Mäusen transplantiert. 0,5 x 10⁶ CD4⁺/CD8⁺ syngene Tconv-Zellen (Tconv) und nTreg-Zellen des Effektorstamms (nTreg auto) oder eines Drittspenderstamms (nTreg allo) wurden in gleicher Zellzahl kotransplantiert.

Wie in **Abb. 3.25** dargestellt, wurden DBA/1 (H-2^a) Empfängerermäusen 5 x 10⁶ T-Zell-depletierte Knochenmarkszellen von BALB/c (**Abb. 3.25 A**) oder C57BL/6 Mäusen (**Abb. 3.25 B**) injiziert und 48 Stunden später 0,5 x 10⁶ syngene CD4⁺ und CD8⁺ Tconv-Zellen im

Verhältnis 2:1 transplantiert. Parallelgruppen erhielten am Tag der KMT zusätzlich $0,5 \times 10^6$ nTreg-Zellen der Spenderstämme BALB/c (**A**) bzw. C57BL/6 (**B**) oder eines Drittpenderstamms (**A**: C57BL/6; **B**: BALB/c). Somit konnten die transplantierten Tiere in vier Versuchsgruppen eingeteilt werden (**Tabelle 3.1**): Mäuse denen nur Knochenmark (KM-Gruppe) oder Knochenmark und $CD4^+/CD8^+$ Tconv-Zellen (GvHD-Gruppe) injiziert wurden, dienten als Kontrolltiere; Empfängerermäuse die zusätzlich nTreg-Zellen des Knochenmark-Spenderstamms bekamen wurden als nTreg auto-Gruppe bezeichnet; Tiere der nTreg allo-Gruppe erhielten Knochenmark- und Tconv-Zellen eines Spenderstamms und allogene nTreg-Zellen eines Drittpenderstamms (allogen zu Empfänger und Stammzellspender).

Um den Krankheitsverlauf der GvH-Erkrankung zu ermitteln, wurde zweimal in der Woche das Gewicht und der klinische GvHD-Score bestimmt (nach Cooke et al. (167), siehe Abschnitt 2.2.5.2). Zudem wurde täglich das Überleben der Tiere überwacht. Empfängertiere wurden entweder nach Erreichen eines klinischen Scores von 6 oder nach einem maximalen Beobachtungszeitraum von 100 Tagen getötet und die zelluläre Zusammensetzung von Milz und Knochenmark analysiert. Zusätzlich wurden die typischen GvHD-Zielorgane Haut, Darm und Leber auf pathologische Auffälligkeiten hin untersucht.

3.4.2.1 Gewichtsverlauf, klinischer Score und Mortalität von DBA/1 Rezipienten nach allogener KMT

In **Abb. 3.26** sind der Gewichtsverlauf, der klinische Score und das Überleben von DBA/1 Empfängerermäusen dargestellt, denen BALB/c Tconv-Zellen injiziert wurden. Alle Tiere der GvHD-Gruppe entwickelten rasch eine schwere GvHD, was durch einen raschen Anstieg des klinischen Scores und einen bis zu 30%igen Gewichtsverlust in den ersten drei Wochen deutlich wurde. Schließlich verstarben alle Tiere der GvHD-Gruppe innerhalb von 40 Tagen. Kontrollmäuse der KM-Gruppe überlebten den Beobachtungszeitraum von 100 Tagen ohne klinische Zeichen einer Krankheit. Analog zu den Befunden im haploidenten KMT-Modell konnten auch bei DBA/1 Empfängerermäusen der nTreg auto-Gruppe keine Hinweise einer GvH-Erkrankung festgestellt werden, so dass die Tiere zu 100% überlebten. Die Mäuse der nTreg allo-Gruppe entwickelten parallel zu den GvHD Kontrollmäusen einen starken Gewichtsverlust, ein ausgeprägtes Krankheitsbild und starben innerhalb von 40 Tagen. Somit konnte gezeigt werden, dass nTreg-Zellen eines Drittpenderstamms nicht vor GvHD schützen, während nTreg-Zellen des Spenderstamms erwartungsgemäß GvHD verhinderten ($p < 0,001$).

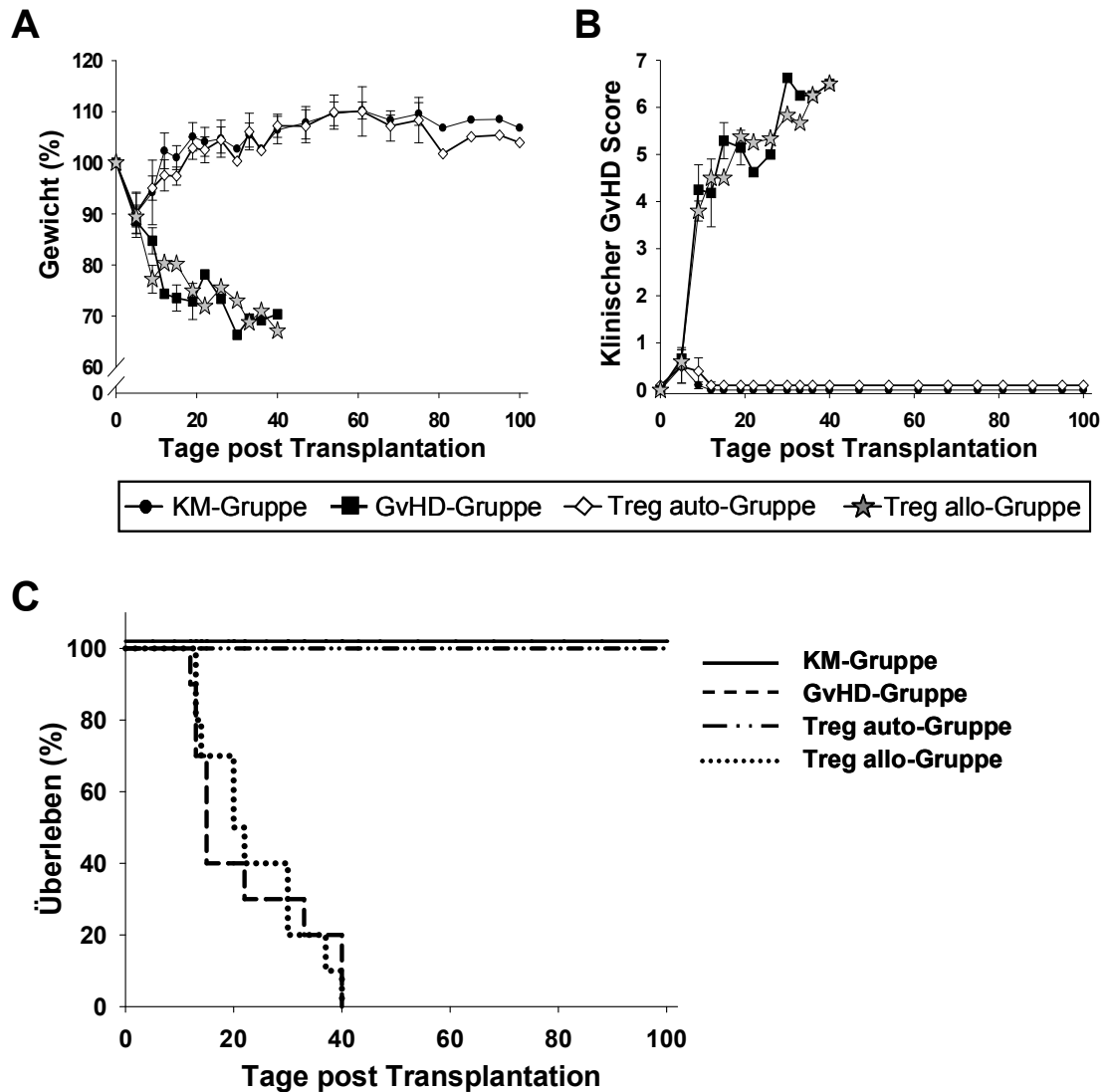


Abb. 3.26: (A) Gewichtsveränderungen, (B) klinischer GvHD-Score und (C) Überleben von DBA/1 Rezipienten nach allogener KMT. Den DBA/1 ($H-2^q$) Empfängermäusen wurden nach letaler Bestrahlung 5×10^6 allogene Knochenmarkzellen (BALB/c; $H-2^d$) alleine (●), oder zusammen mit $0,5 \times 10^6$ $CD4^+/CD8^+$ (2:1) BALB/c Tconv-Zellen (■) oder zusätzlich $0,5 \times 10^6$ autologe BALB/c (◇) bzw. allogene C57BL/6 (★) nTreg-Zellen transplantiert. Gezeigt sind die Ergebnisse von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit insgesamt 10 Tieren pro Gruppe. Der Unterschied hinsichtlich des Überlebens der Tiere der Treg auto- und Treg allo-Gruppe ist statistisch signifikant ($p < 0,001$; nach Kaplan Meier).

Bei Verwendung von C57BL/6 statt BALB/c Tconv-Zellen konnte ebenfalls ein Unterschied im suppressiven Effekt autologer versus allogener nTreg-Zellen festgestellt werden (**Abb. 3.27**). 87% der DBA/1 Empfängermäuse der KM-Gruppe lebten über 100 Tage ohne Anzeichen einer GvH-Erkrankung. Dagegen entwickelten alle Tiere der GvHD-Gruppe deutliche Anzeichen einer GvHD (Daten nicht gezeigt) und 95% der Tiere verstarben innerhalb von 40 Tagen. Ebenso zeigten alle Tiere der nTreg allo-Gruppe eine starke GvH-

Erkrankung und auch hier starben 94% der Tiere innerhalb des Beobachtungszeitraums. Im Gegensatz dazu konnten Mäuse der nTreg auto-Gruppe teilweise einen Schutz aufbauen. 73% dieser Tiere überlebten bis Tag 40, einem Zeitpunkt zu dem bereits 13 von 15 Tieren der nTreg allo-Gruppe verstorben waren. Insgesamt konnten 40% der Mäuse der nTreg auto-Gruppe einen Schutz vor letaler GvHD aufbauen. Obwohl die GvH-Reaktion durch Gabe autologer nTreg-Zellen bei diesem Modell der allogenen KMT ($H-2^b \rightarrow H-2^q$) nicht vollständig unterdrückt werden konnte, ließ sich ein signifikanter Überlebensvorteil gegenüber den Mäusen der nTreg allo-Gruppe feststellen ($p=0,006$).

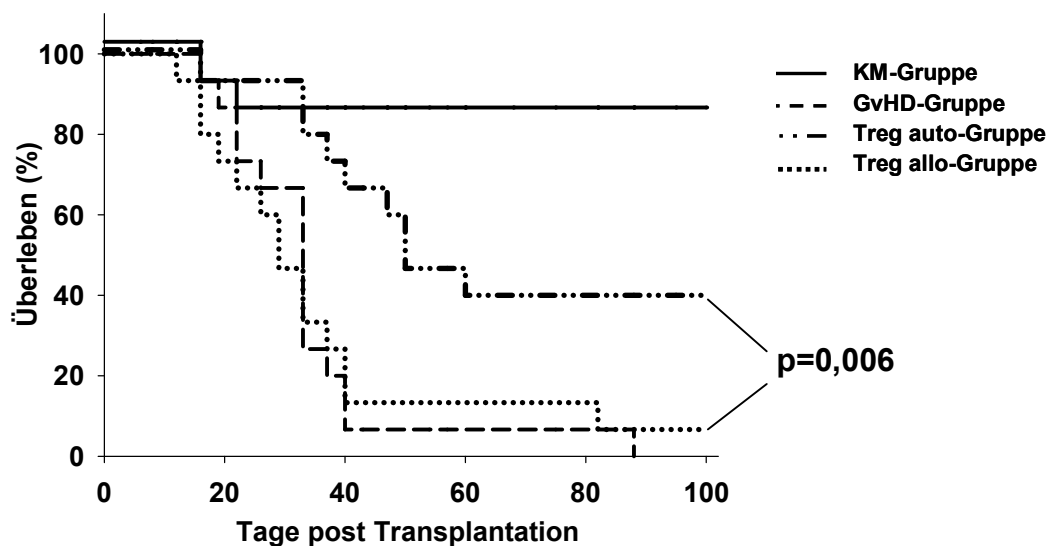


Abb. 3.27: Überleben von DBA/1 Rezipienten nach allogener KMT. Letal bestrahlte DBA/1 ($H-2^q$) Rezipienten wurden mit 5×10^6 allogenen C57BL/6 ($H-2^b$) Knochenmarkzellen alleine (●), oder zusammen mit $0,5 \times 10^6$ $CD4^+/CD8^+$ (2:1) C57BL/6 Tconv-Zellen(■) und zusätzlich $0,5 \times 10^6$ autologen (C57BL/6; ♦) bzw. allogenen (BALB/c;★) nTreg-Zellen transplantiert. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit insgesamt 15 Tieren pro Gruppe. Der Unterschied hinsichtlich des Überlebens der Tiere der Treg auto- und Treg allo-Gruppe ist statistisch signifikant ($p=0,006$; nach Kaplan Meier).

Die gezeigten Daten machen deutlich, dass auch in diesem Modell einer allogenen KMT über komplette MHC-Grenzen hinweg, ein Schutz vor akuter GvHD nur durch die Kotransplantation autologer nTreg-Zellen zu erreichen ist. Dagegen sind nTreg-Zellen eines Drittpenderstamms, ähnlich wie im vorher gezeigten F1 Modell, nicht in der Lage eine protektive Wirkung zu entfalten.

3.4.2.2 Histopathologische Veränderungen im Darm von GvHD-erkrankten Tieren

Um eine Aussage über den Schweregrad der GvH-Erkrankung in transplantierten Tieren der KM-, GvHD-, nTreg auto- und nTreg allo-Gruppen zu treffen, wurden histopathologische Untersuchungen von Leber, Darm und Haut durchgeführt. Die GvHD-Zielorgane wurden bei gesunden Mäusen nach Versuchsende (Tag 100) bzw. bei erkrankten Tieren am Tag ihrer Euthanasie entnommen. Als Maß der Gewebeschädigung wurde ein histopathologischer Score verblindet durch Dr. T. Schubert (Pathologie Regensburg; seit 2008 Frankfurt) ermittelt, der auf einer Skala von Grad 0 bis Grad 4 bewertet wurde. Die histopathologischen Analysen von Leber, Darm und Haut ergaben nur im Darm von GvHD-erkrankten Tieren pathologische Veränderungen. Hierbei zeigten erneut nur die Tiere der GvHD-Gruppe und der nTreg allo-Gruppe einen Score, während Tiere, die autologe nTreg-Zellen transplantiert bekamen, komplett vor histologischen Veränderungen der GvHD geschützt waren (**Abb. 3.28 A**).

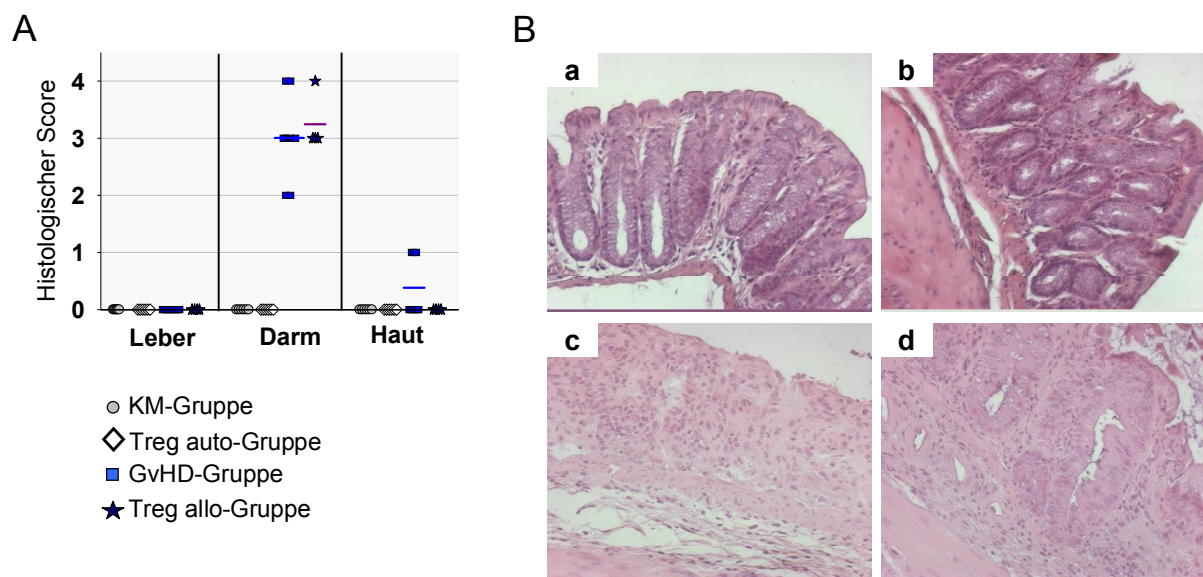


Abb. 3.28: Histologie von allogenen transplantierten DBA/1 Empfängertieren. **(A)** Histopathologischer GvHD-Score der Leber, der Haut und des Darms von DBA/1 Rezipienten der KM-, nTreg auto-, GvHD- und nTreg allo-Gruppe denen BALB/c Tconv-Zellen transplantiert wurden. Vergabe des histopathologischen Scores erfolgte verblindet durch einen unabhängigen Pathologen. Die Organe wurden auf einer Skala von 0 bis 4 gewertet. Die Einstufung erfolgte an HE gefärbten Paraffinschnitten nach Grass et al. und Hill et al. (152, 168). Die einzelnen Symbole stellen jeweils ein Tier pro Gruppe dar. **(B)** Exemplarische Darstellung eines repräsentativen Ausschnittes des Kolons aller vier Versuchsgruppen: (a) KM-Gruppe, (b) nTreg auto-Gruppe, (c) GvHD-Gruppe und (d) nTreg allo-Gruppe. Gezeigt sind die Gewebeschnitte von Tieren der GvHD- und nTreg allo-Gruppe mit einem histologischen Score von 4. Die Organe gesunder Tiere wurden nach Versuchsende (Tag 100), GvHD-erkrankter Tiere am Tag ihrer Euthanasie entnommen. Es wurden Mäuse aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten analysiert, mit 4 bis 8 Tieren pro Gruppe. 100fache Vergrößerung des Darms.

Abb. 3.28 B zeigt repräsentative Ausschnitte der Histologie des Kolons aller vier Versuchgruppen. In Mäusen der nTreg auto-Gruppe (**Abb. 3.28 B [b]**) wurden ebenso wie in der KM-Kontrollgruppe (**Abb. 3.28 B [a]**) keine krankhaften Veränderungen der Kolonschleimhaut oder Veränderungen im Deckepithel und im Zellgehalt beobachtet. Dagegen wurde der Darm (Kolon) der GvHD- (**Abb. 3.28 B [c]**) und nTreg allo-Gruppen (**Abb. 3.28 B [d]**) histopathologisch als akute GvHD Grad 4 beurteilt. Es konnten Erosionen des Oberflächenepithels und ein vollständiger Verlust der Krypten festgestellt werden. Neben Einzelzellapoptosen und einer starren, zellarmen bindegewebsartigen Fibrose der *Tunica propria* wurde zudem auch ein florides Infiltrat aus neutrophilen Granulozyten beobachtet.

3.4.2.3 Unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung in Milz und Knochenmark in DBA/1 Rezipienten nach Kotransplantation von autologen oder allogenen nTreg-Zellen

Im Folgenden wurde die zelluläre Zusammensetzung von Milz und Knochenmark der DBA/1 Empfängertiere untersucht, denen BALB/c Tconv-Zellen transplantiert wurden. Den Mäusen der GvHD- und nTreg allo-Gruppen wurden zum Zeitpunkt ihres GvHD-bedingten Sterbens die Organe entnommen. Tiere der KM- und nTreg auto-Gruppen wurden am Ende des 100tägigen Beobachtungszeitraums analysiert. Splenozyten und Knochenmarkzellen wurden mit Antikörpern gegen Granulozyten-, Monozyten-, B- und T-Zellmarker gefärbt und anschließend im FACS gemessen. Untersucht wurde sowohl die Gesamtzellzahl an Milz- und Knochenmarkzellen als auch deren zelluläre Zusammensetzung. Als Kontrollen dienten Milz- und Knochenmarkzellen von unbehandelten Empfänger- (DBA/1) bzw. Spendertieren (BALB/c).

Wie in **Abb. 3.29** zu sehen, weisen Mäuse der KM- und der nTreg auto-Gruppe einen ähnlichen Milzzellgehalt auf (KM-Gruppe: $104 \times 10^6 \pm 2,5 \times 10^6$ Zellen; nTreg auto-Gruppe: $116 \times 10^6 \pm 29,1 \times 10^6$ Zellen), der fast doppelt so hoch lag wie bei unbehandelten Kontrolltieren (DBA/1: $51,7 \times 10^6 \pm 7,5 \times 10^6$ Zellen; BALB/c: $65,7 \times 10^6 \pm 16,0 \times 10^6$ Zellen). Im Gegensatz dazu konnte in Empfängermäusen der GvHD- und der nTreg allo-Gruppe eine stark reduzierte Gesamtmilzzahl beobachtet werden (GvHD-Gruppe: $8,3 \times 10^6 \pm 2,1 \times 10^6$ Zellen; nTreg allo-Gruppe: $10,7 \times 10^6 \pm 6,3 \times 10^6$ Zellen). Dies lässt sich durch die Zerstörung der Milzarchitektur durch die GvH-Reaktion erklären. Die Gesamtzellzahl im Knochenmark der Tiere aller transplantierten Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede, war aber im Vergleich zu den Zellzahlen unbehandelter Kontrolltiere deutlich reduziert.

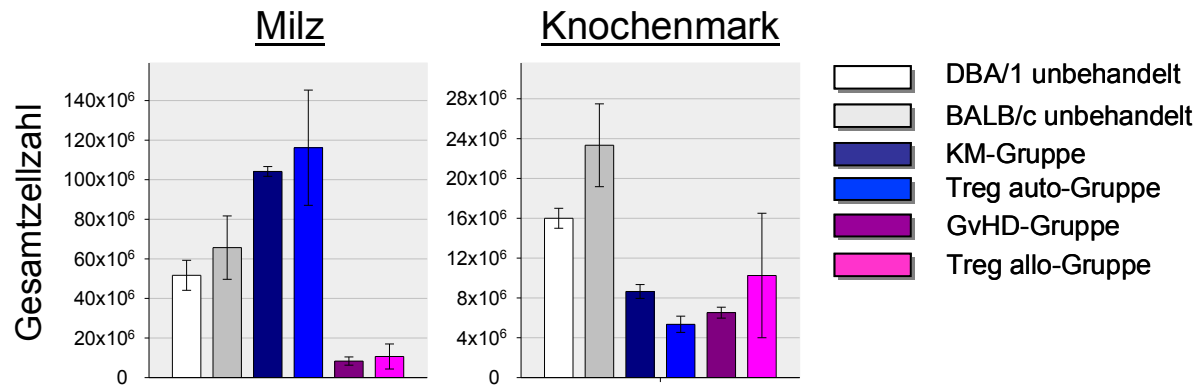


Abb. 3.29: Gesamtzellzahl von Milz und Knochenmark in DBA/1 Rezipienten nach Transplantation von BALB/c Tconv-Zellen. Tieren der KM- und der nTreg auto-Gruppen wurden Milz und Knochenmark am Ende des Beobachtungszeitraums von 100 Tagen entnommen und analysiert. Tiere der GvHD- und der nTreg allo-Gruppe wurden am Tag ihres GvHD-bedingten Sterbens untersucht. Als Kontrolle dienten Milz und Knochenmark von unbehandelten Spender- (BALB/c) und Empfängertieren (DBA/1). Alle analysierten Tiere der GvHD- und nTreg allo-Gruppen verstarben an akuter GvHD zwischen Tag 14 und Tag 40 nach KMT. Es wurden 3 bis 5 Tiere pro Gruppe, aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten und jeweils 3 unbehandelte Mäuse analysiert.

Weitere Unterschiede fanden sich in der zellulären Zusammensetzung von Milz und Knochenmark zwischen den einzelnen Gruppen. Wie in **Abb. 3.30** dargestellt, enthielten die Milzen der Tiere der KM- und der nTreg auto-Gruppe eine jeweils vergleichbare Menge an Granulozyten, Monozyten, B- und T-Zellen, wobei vor allem eine gegenüber unbehandelten Tieren erhöhte Anzahl von B-Zellen für die insgesamt erhöhte Zellularität (siehe Abb. 3.29) dieses Organs verantwortlich ist. Dagegen konnten weder in der Milz (**A**) noch im Knochenmark (**B**) von Tieren der GvHD- und der nTreg allo-Gruppe B-Zellen detektiert werden, und auch die Zahl der T-Zellen und Monozyten in diesen Tieren war stark vermindert. Im Vergleich zu gesunden Rezipienten wurde allerdings eine erhöhte Anzahl an Granulozyten gemessen. Die Unterteilung der T-Zellen in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten ergab eine Verschiebung des normalen T-Zellverhältnisses (CD4:CD8 von 2:1 bis 3:1) in Richtung der $CD8^+$ T-Zellen (CD4:CD8 = 1:2). In allen Mäusen konnte ein kompletter Donorchimärismus in Milz und Knochenmark beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

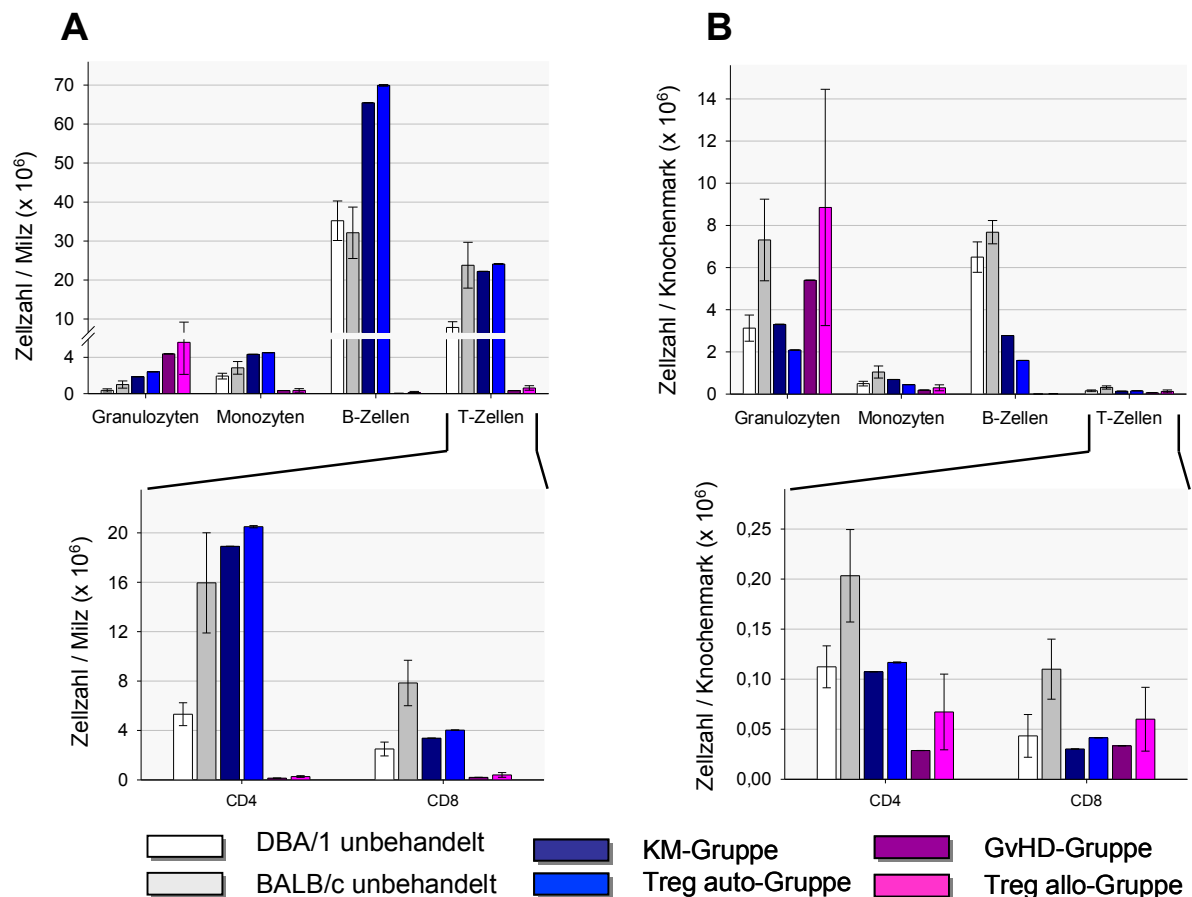


Abb. 3.30: Zellanalysen von (A) Milz und (B) Knochenmark von unterschiedlich transplantierten DBA/1 Empfänger-tieren: KM-Gruppe: dunkelblau, GvHD-Gruppe: dunkelrot, nTreg auto-Gruppe: blau und nTreg allo-Gruppe: pink. GvHD induzierende Tconv-Zellen wurden aus BALB/c Mäusen isoliert. Gezeigt ist die Anzahl an Granulozyten, Monozyten, B- und T-Zellen. T-Lymphozyten wurden zusätzlich in CD4 und CD8 T-Zellen unterteilt. Zum Vergleich wurden Milz und Knochenmark (Zellen aus zwei Hinterläufen) von unbehandelten Spender- (BALB/c; grau) bzw. Empfänger-tieren (DBA/1; weiß) analysiert. Tiere der KM- bzw. nTreg auto-Gruppe wurden an Tag 100 analysiert. Alle analysierten Tiere der GvHD- und nTreg allo-Gruppen verstarben an akuter GvHD zwischen Tag 14 und Tag 40 nach KMT. Es wurden 3 bis 5 Tiere pro Gruppe aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten, und jeweils 3 unbehandelte Mäuse analysiert.

In der Summe ergaben die durchflußzytometrischen Analysen der zellulären Zusammensetzung von Milz und Knochenmark auch in diesem Modell einen signifikanten Unterschied zwischen Rezipienten der nTreg auto- und nTreg allo-Gruppe. Mäuse der nTreg allo-Gruppe konnten keinen Schutz vor einer letalen GvHD aufbauen (siehe Abb. 3.26) und zeigten dabei gleiche zelluläre Merkmale wie Tiere der GvHD-Gruppe. Dagegen kam es bei Versuchstieren der nTreg auto-Gruppe an Tag 100 zu einem fast identischen zellulären Bild wie in der KM-Gruppe. Folglich korreliert der Schutz vor GvHD durch autologe nTreg-Zellen mit der verbesserten Immunrestitution nach Transplantation, die mit diesen Analysen auch auf zellulärer Ebene bestätigt werden konnte.

3.4.3 Suppression der frühen Expansion von Tconv-Zellen durch autologe nTreg-Zellen

Die gegen Alloantigene des Empfängers gerichtete Immunreaktion der transplantierten $CD4^+/CD8^+$ Tconv-Zellen wurde in den bisher geschilderten Versuchen nur indirekt durch Analysen der Zellzusammensetzung von Milz und Knochenmark, oder durch die histologische Untersuchung typischer GvHD Zielorgane (Haut, Darm und Leber) nachgewiesen. Dagegen konnte über die räumliche und zeitliche Verteilung allogene transplantierte Tconv-Zellen keine Aussage getroffen werden. Auch histologische Untersuchungen der einzelnen Zielgewebe waren an Organentnahmen zu bestimmten Zeitpunkten gebunden. Um nun die Expansion und Migration von GvHD-induzierenden $CD4^+/CD8^+$ Tconv-Zellen in Echtzeit im lebenden Versuchstier verfolgen zu können wurde das nicht-invasive Verfahren der *in vivo* Biolumineszenz angewandt.

Diese Methode beruht auf einer chemischen Reaktion, bei der das Enzym Luziferase, unter Verbrauch von Sauerstoff und ATP, das Substrat Luziferin (Leuchtstoff) decarboxyliert und dabei Lichtquanten emittiert. Diese Photonen können biologisches Gewebe durchdringen und außerhalb des Körpers von einer CCD Kamera gemessen werden. Für diese Untersuchungen wurden $CD4^+/CD8^+$ Tconv-Zellen aus einer transgenen FVB/N-luc Maus ($H-2^q$) isoliert, die das Reporter-Gen Luziferase in allen hämatopoetischen Zellen exprimiert.

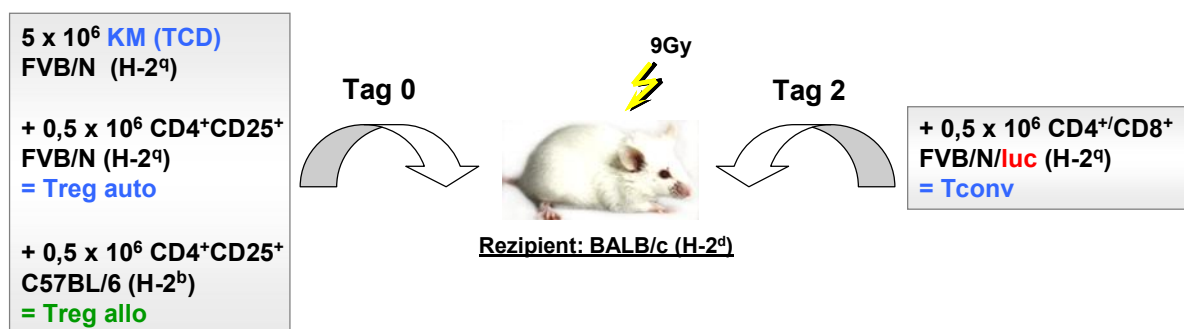


Abb. 3.31: KMT-Modell zur Verfolgung transplantierter Tconv-Zellen in Echtzeit im lebenden Tier. BALB/c ($H-2^d$) Rezipienten wurden letal bestrahlt (900 cGy) und mit 5×10^6 Knochenmarkzellen (KM TCD) der FVB/N Maus ($H-2^q$) rekonstituiert. Am gleichen Tag erhielten sie $0,5 \times 10^6$ autologe (FVB/N) oder allogene (C57BL/6, $H-2^b$) nTreg-Zellen. Nach 2 Tagen wurden ihnen GvHD-induzierende luc+ Tconv-Zellen der FVB/N/luc Maus injiziert.

Wie in **Abb. 3.31** dargestellt, wurden BALB/c ($H-2^d$) Rezipienten mit 900 cGy letal bestrahlt und erhielten danach 5×10^6 allogene FVB/N ($H-2^q$) Knochenmarkzellen. Am gleichen Tag wurden ihnen $0,5 \times 10^6$ autologe FVB/N ($H-2^q$) bzw. allogene C57BL/6 ($H-2^b$) nTreg-Zellen

transplantiert. Um eine GvH-Reaktion zu erhalten, wurden nach 48 Stunden $0,5 \times 10^6$ Luziferase-positive (luc+) $CD4^+/CD8^+$ Tconv-Zellen der FVB/N-luc Maus injiziert. Durch Injektion von Luziferin konnte die Migration und Proliferation der luc+ Tconv-Zellen an unterschiedlichen Tagen im lebenden Tier untersucht werden.

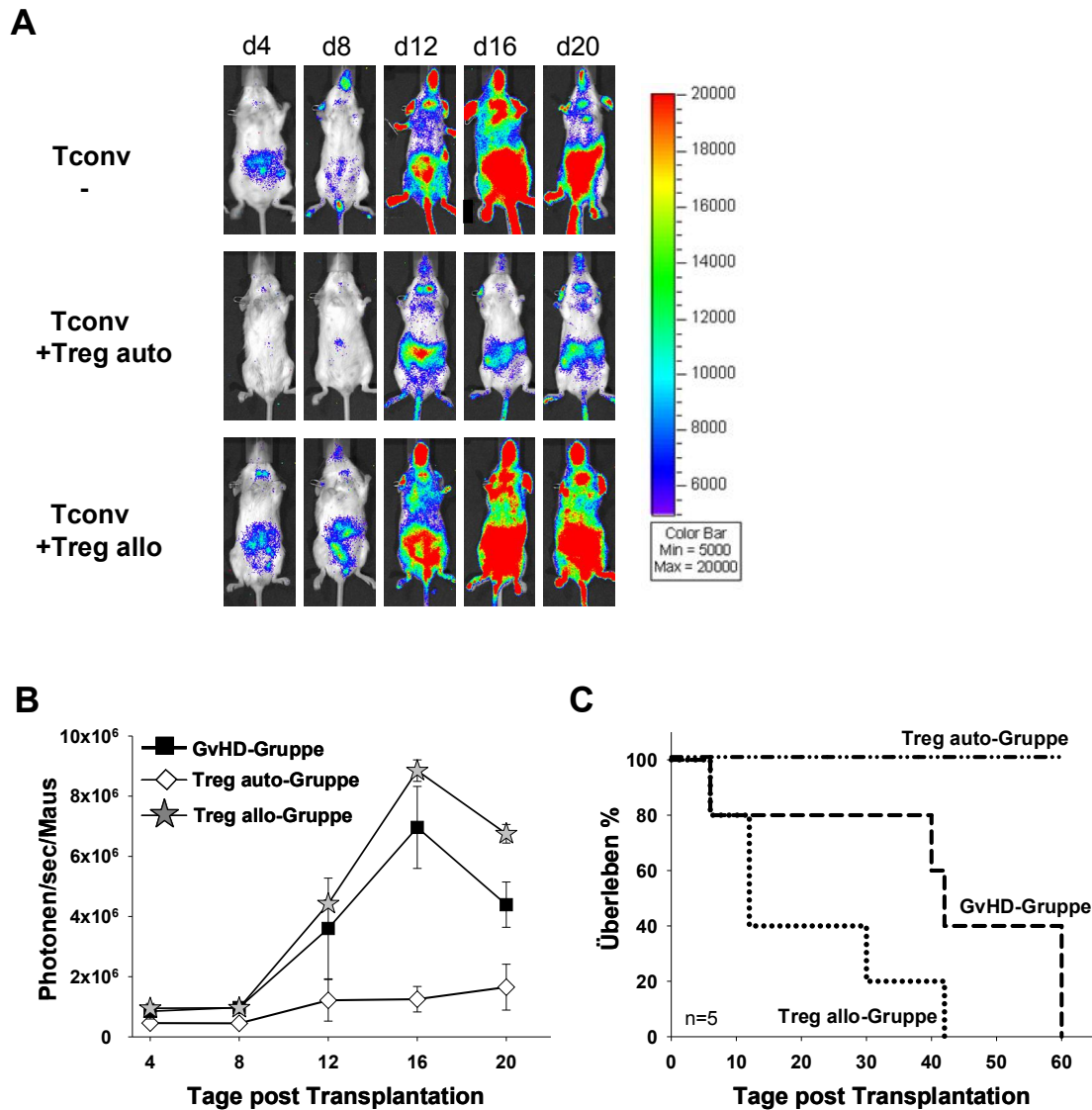


Abb. 3.32: Analyse der frühen Expansion von $CD4^+/CD8^+$ luc+ Tconv-Zellen. BALB/c Rezipienten wurden nach letaler Bestrahlung mit 5×10^6 FVB/N Knochenmarkzellen und $0,5 \times 10^6$ nTreg-Zellen der FVB/N (Treg auto) bzw. der C57BL/6 (Treg allo) Maus transplantiert. Zusätzlich wurden nach 2 Tagen $0,5 \times 10^6$ $CD4^+/CD8^+$ luc+ FVB/N T-Zellen injiziert. (A) Dargestellt ist die Expansion $CD4^+/CD8^+$ luc+ Tconv-Zellen innerhalb von 3 Wochen durch ein repräsentatives Tier pro Gruppe. Die Expansion von $CD4^+/CD8^+$ luc+ Tconv-Zellen wird quantitativ durch die Emission von Photonen über die gesamte Körperfläche bestimmt. Dargestellt ist (B) der durchschnittliche Wert der emittierten Lichtquanten und (C) die Mortalität von 5 Mäusen pro Gruppe: GvHD- (■), nTreg auto- (◇) und nTreg allo-Gruppe (★).

Abb. 3.32 A/B zeigt die Kinetik der Expansion anhand der Photonenemission (Photonenabgabe/sec/Maus) von Tconv-Zellen die entweder alleine (Tconv), oder zusammen mit autologen (Tconv + nTreg auto) bzw. allogenen (Tconv + nTreg allo) nTreg-Zellen transplantiert wurden. In der Tconv-Gruppe konnte eine Expansion ab Tag 4 beobachtet werden, mit einem leichten Anstieg an Tag 8 und danach einer exponentiellen Zunahme der Photonenemission bis Tag 16. Danach ließ die Intensität der Biolumineszenz wieder nach, was den Rückgang des alloreaktiven T-Zell-Pools widerspiegelte. Die Tconv-Zellen in diesen Tieren wanderten überwiegend in die Milz und den Gastrointestinaltrakt, aber auch in die Lunge und die Lymphknoten. Die frühe Expansion und Migration der Tconv-Zellen ging mit einer starken GvH-Reaktion (Daten nicht gezeigt) und einer 100%igen Mortalität innerhalb von 60 Tagen einher (**Abb. 3.32 C**). In Anwesenheit von allogenen nTreg-Zellen wurde eine ähnliche Proliferation und Verteilung der Tconv-Zellen beobachtet. Die Photonenemission der Mäuse der nTreg allo-Gruppe verhielt sich analog zur GvHD-Gruppe, mit einem exponentiellen Anstieg der Photonenzahl von Tag 8 bis Tag 16. Vergleicht man in diesen Tieren die Expansion der Tconv-Zellen (Anzahl an emittierten Photonen pro Maus) mit dem Überleben der transplantierten Tiere, so zeigte sich in diesen Rezipienten neben der höchsten Quantenintensität zudem die früheste Mortalität. In Anwesenheit von autologen nTreg-Zellen konnte dagegen ein gleichbleibend niedriges Niveau der Photonenausbeute pro Maus über den gesamten Zeitraum von 3 Wochen beobachtet werden. Im Gegensatz zu den Tieren der GvHD- und nTreg allo-Gruppen verteilten sich die Tconv-Zellen in Gegenwart von autologen nTreg-Zellen jedoch vorwiegend in LN, Milz und Leber. Die Inhibierung der Expansion von Tconv-Zellen ging mit einem Schutz vor GvHD einher, so dass 100% der Tiere überlebten.

Zusammenfassend lässt sich mit dem BLI-Verfahren zeigen, dass autologe nTreg-Zellen die frühe Expansion der transplantierten Tconv-Zellen in allogenen Empfängern unterdrücken. Diese Inhibition der frühen Expansion führt zu einem Schutz vor letaler GvHD. Im Gegensatz dazu kann die Anwesenheit von nTreg-Zellen eines Drittsponderstamms die rasche Expansion und bevorzugte Migration in den Gastrointestinaltrakt der Tconv-Zellen nicht supprimieren und somit die Zerstörung der Zielorgane und das frühe Versterben der Mäuse nicht verhindern.

4 Diskussion

Sakaguchi et al. beschrieben 1995 erstmals eine Population von CD4⁺ T-Zellen, die konstitutiv CD25 exprimiert und eine starke regulatorische Funktion *in vitro* und *in vivo* aufweist (67). Diese nTreg-Zellen werden im Thymus als separate Zellpopulation gebildet und spielen eine unentbehrliche Rolle für den Erhalt der Selbsttoleranz (69, 70) und für die Immunhomöostase (71). Eine Reihe von tierexperimentellen Studien zur allogenen KMT zeigten, dass nTreg-Zellen auch die gegen Alloantigene gerichtete Immunreaktion von Tconv-Zellen unterdrücken können und ihre Kotransplantation zum Schutz vor GvHD beiträgt (74, 161-163). Dabei wird in erster Linie die frühe, alloantigenspezifische Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterdrückt, ihre Aktivierung und Reifung aber nicht vollständig inhibiert, so dass der schützende GVL-Effekt z.T. erhalten bleibt (163). Interessanterweise stellte sich heraus, dass nur kotransplantierte nTreg-Zellen des Knochenmarkspenders die Alloreaktivität der GvH-induzierenden Tconv-Zellen unterdrücken, während nTreg-Zellen des Empfängerstamms nicht in der Lage waren vor GvHD zu schützen (161). Ebenso wurde *in vitro* gezeigt, dass nur nTreg-Zellen des Responderstamms, nicht aber des Stimulatorstamms die Proliferation alloreaktiver Tresp-Zellen unterdrücken. Als mögliche Erklärungen für diese Beobachtungen wurde angenommen, dass nTreg-Zellen durch allogene T-Zellen entweder frühzeitig zerstört werden oder aber, dass nTreg-Zellen kaum in der Lage sind, alloaktivierte T-Zellen MHC-differentierender Mausstämmen zu supprimieren. Im Rahmen dieser Dissertation sollten diese Hypothesen überprüft werden, wobei die generierten *in vitro* und *in vivo* Daten die zweite Hypothese bestätigen.

4.1 Suppression von Tresp-Zellen durch autologe nTreg-Zellen

Die *in vitro* Untersuchungen zur Suppression von Tresp-Zellen durch nTreg-Zellen erforderten den Einsatz hochreiner Zellpopulationen. Die detaillierte phänotypische Charakterisierung von CD4⁺ Splenozyten zeigte, dass sich die Zellen bezüglich ihrer CD25 Expression in drei verschiedene T-Zellpopulationen (CD4⁺CD25^{high}, CD4⁺CD25^{int} und CD4⁺CD25^{neg}) unterteilen ließen. Während im Menschen diese drei Populationen unter den CD4⁺ T-Zellen schon länger beschrieben sind (170, 171), wurde bisher bei der Maus in der

Regel nur zwischen $CD4^+CD25^+$ und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen unterschieden (76). Lediglich in $CD4^+CD25^{high}$ T-Zellen konnte eine homogene, konstitutive Expression der charakteristischen nTreg-Marker FoxP3 (69), CTLA-4 (110) und CD134 (97) nachgewiesen werden. Die $CD4^+CD25^{int}$ Population zeigte dagegen eine heterogene Expression, wohingegen ruhende $CD4^+CD25^{neg}$ T-Zellen keines dieser Moleküle exprimierten. In verschiedenen Studien wurde mittels Genexpressionsanalysen gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor FoxP3 die Expression von CD25 und CTLA-4 in nTreg-Zellen kontrolliert, indem er im Komplex mit NFAT in den jeweiligen Promotorregionen bindet und die Expression der Gene hochreguliert (87, 172). Tresp-Zellen können CTLA-4 und CD134 dagegen erst nach Aktivierung des TCR exprimieren (46, 49, 164). Im humanen peripheren Blut befinden sich nTreg-Zellen vorwiegend in der $CD4^+CD25^{high}$ Population (173), während $CD4^+$ T-Zellen mit intermediärer CD25 Expression hauptsächlich aus *in vivo* aktivierten Tresp-Zellen bestehen. Dies konnte nun erstmals auch für $CD4^+$ T-Zellen der Maus bestätigt werden, weshalb in der vorliegenden Arbeit ein zweistufiger Aufreinigungsprozess entwickelt wurde, um mit größtmöglicher Sicherheit eine homogene, hochreine nTreg-Population in den Versuchen einsetzen zu können. Durch die magnetische Separation über CD25 und die anschließende Zellsortierung konnte eine Kontamination von aktivierten $CD4^+CD25^{int}$ T-Zellen vermieden und eine Reinheit von über 99% für die $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ nTreg-Zellen erreicht werden.

Zur Gewinnung ihrer suppressiven Aktivität müssen nTreg-Zellen über ihren TCR aktiviert werden (79). Der Nachweis ihrer suppressiven Wirkung erfolgt meist nach polyklonaler Stimulation. In den letzten Jahren machten zahlreiche Studien deutlich, dass die Art der Stimulation nicht unerhebliche Auswirkungen auf die beobachtete Suppression hat. So kommt es nach Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern, präsentiert auf autologen APCs (T-Zell-depletierte Milzzellen oder DCs), zu einer sehr starken Suppression (104, 161), während die zusätzliche Stimulation über anti-CD28 Antikörper die suppressive Wirkung teilweise oder ganz aufheben kann (75, 174). Baecher-Allan et al. postulierten, dass durch Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 in Gegenwart von APCs Tresp-Zellen in ihrem Aktivierungsstadium so erhöht sind, dass sie keine Sensitivität gegenüber der Suppression von nTreg-Zellen mehr zeigen (175). Eine direkte Stimulation von Tresp-Zellen über anti-CD28 Antikörper führt zu einer verstärkten Transkription von IL-2 und einer daraus resultierenden T-Zell-Proliferation (176). Diese direkte Aktivierung der CD28-Signalkaskade dominiert über die natürliche Inhibition der Tresp-Zellen durch das vermutlich CTLA-4-vermittelte Signal. Normalerweise konkurriert CTLA-4 mit CD28 um die natürlichen Liganden CD80/CD86 und bindet vor allem CD80 mit höherer Affinität (177). Im Gegensatz zu CD28 unterdrückt CTLA-4 die IL-2-Produktion und vermindert somit die T-Zell-Aktivierung (48). Zusätzlich kann CTLA-4 die

CD80/CD86 Expression auf APCs herunterregulieren und dadurch die Stimulation der Tresp-Zellen indirekt vermindern (110, 111). Durch die direkte Aktivierung der MAPK-Signalkaskade über anti-CD28 Antikörper sind Tresp-Zellen nicht mehr auf ihre natürlichen Liganden CD80/CD86 auf APCs angewiesen und somit nicht mehr sensitiv für die Inhibition über das CTLA-4 Signal. Zudem postulierten Takahashi et al., dass die Stimulation mit anti-CD28 Antikörper nicht nur zu einer überschießenden Aktivierung von Tresp-Zellen führt, sondern auf der anderen Seite auch zum Abbruch des anergen Status der nTreg-Zellen und zu einer Verminderung ihrer suppressiven Aktivität (92, 104). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die suppressive Wirkung von nTreg-Zellen nach polyklonaler Stimulation untersucht. Hierzu wurden bestrahlte, T-Zell-depletierte Milzzellen und anti-CD3 Antikörper verwendet. Eine Kostimulation der T-Zellen über CD28 (auf den APCs) findet auch hier statt, allerdings haben Tresp- und nTreg-Zellen nun die Möglichkeit sowohl mit CD28, als auch mit CTLA-4 an CD80/CD86 zu binden und entsprechende Signalkaskaden zu aktivieren. Die Proliferation von Tresp-Zellen wurde in diesem System effizient inhibiert und es zeigte sich, dass nTreg-Zellen unter diesen Bedingungen sowohl autologe als auch allogene Tresp-Zellen supprimieren können. Die Arbeitsgruppe um D.Hafler postulierte, dass sowohl die Stärke der Stimulation von Tresp-Zellen, als auch die von nTreg-Zellen einen Einfluss auf das Ausmaß der beobachteten Suppression hat (165). Sie zeigten mittels ^3H -Thymidin-Einbau, dass Tresp-Zellen durch plattengebundenes (pb) anti-CD3 stärker stimuliert werden als mit löslichem bzw. Bead-gebundenem anti-CD3 Antikörper. Die Zugabe von nTreg-Zellen führte überraschenderweise in Kulturen mit pb anti-CD3 Antikörpern zu keiner Inhibition der Proliferation von Tresp-Zellen. Um zu überprüfen, ob durch die verschiedenen Stimulationsstärken entweder Tresp-Zellen resistent gegenüber der Suppression, oder nTreg-Zellen in ihrer suppressiven Funktion inaktiviert waren, wurden beide T-Zell-Subpopulationen vor der Kokultur getrennt aktiviert. Hier zeigten sie u.a., dass stark aktivierte Tresp-Zellen nur durch schwach stimulierte nTreg-Zellen, nicht aber durch stark voraktivierte nTreg-Zellen inhibiert werden können. Schwach voraktivierte Tresp-Zellen waren dagegen sensitiv gegenüber der Suppression durch nTreg-Zellen, unabhängig vom Ausmaß der vorangegangenen nTreg-Stimulationsstärke. Es ist jedoch zu bedenken, dass diese Aussagen ausschließlich auf der Messung des ^3H -Thymidin-Einbaus in den jeweiligen Kokulturen beruhen und dadurch keine Aussage über das Proliferationsverhalten der eingesetzten T-Zell-Subpopulationen getroffen werden konnte. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch nTreg-Zellen unter solchen Kulturbedingungen proliferieren, ist eine durchflußzytometrische Analyse solcher Kokulturen mittels CFSE-Markierung vorzuziehen, da hierdurch tatsächlich auch Aussagen über das unterschiedliche Proliferationsverhalten von Tresp- und nTreg-Zellen gemacht werden können. Außerdem muß die Behauptung der stärkeren Stimulation durch pb anti-CD3 Antikörper kritisch bewertet werden, da die

unterschiedlichen Stimulationsbedingungen oftmals zu einem ähnlichen ^3H -Thymidin-Einbau führten. Falls allerdings die Stimulationsstärke tatsächlich einen Einfluss auf das Ausmaß der suppressiven Aktivität von nTreg-Zellen hat, stellte sich die Frage, ob nTreg-Zellen verschiedener Mausstämmen eine unterschiedliche Sensitivität für Aktivierungssignale aufweisen und sich die von Hoffmann et al. (161) beschriebene verminderte Suppression allogener Tresp-Zellen in der MLR hierdurch erklären lässt. In einem Konzentrationsbereich von 500 ng/ml bis zu 0,5 ng/ml anti-CD3 konnte eine identische suppressive Aktivität von nTreg-Zellen aus Balb/c und C57BL/6 Mäusen beobachtet werden und beide nTreg-Zellpopulationen waren unter diesen Bedingungen in der Lage, auch Tresp-Zellen des MHC-differenten Mausstammes zu supprimieren. Diesen Ergebnissen nach scheint durch die Stimulation mit anti-CD3 eine direkte Aktivierung des TCR der nTreg-Zellen (mit Aktivierung der nachgeschalteten intrazellulären Signalkaskaden) zu erfolgen, so dass die nTreg-Zellen ihre suppressiven Effektormechanismen aktivieren. Ausserdem zeigten diese Ergebnisse, dass eine Suppression von allogenen Tresp-Zellen nicht prinzipiell unmöglich ist.

Die polyklonale Stimulation der Tresp-Zellen entspricht jedoch nicht der *in vivo* Situation nach allogener KMT, bei der nur ca. 1-10% aller Tresp-Zellen direkt allogene MHC-Moleküle erkennen, die hauptsächlich von Empfänger-APCs präsentiert werden (20, 138). Analog zu dem in früheren Studien (161) und in dieser Arbeit eingesetzten allogenen KMT-Modell sollten Tresp- und nTreg-Zellen dabei *in vitro* durch direkte Alloantigenerkennung aktiviert und der suppressive Effekt von autologen und allogenen nTreg-Zellen untersucht werden. In einem ersten Ansatz erfolgte die Stimulation durch eine 1:1 Mischung aus APCs beider untersuchter Mausstämmen (BALB/c und C57BL/6). Dies entspricht bis zu einem gewissen Grad der Situation in den früheren *in vivo* Studien, in denen zumindest kurz nach allogener KMT sowohl APCs des Rezipienten, als auch solche des Spenders gleichzeitig vorhanden waren. Unter diesen Bedingungen wurde die Proliferation von BALB/c Tresp-Zellen nur durch autologe BALB/c nTreg-Zellen inhibiert, während allogene C57BL/6 nTreg-Zellen keinen Einfluss auf die Expansion der BALB/c Tresp-Zellen hatten. Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn C57BL/6 Tresp-Zellen mit autologen C57BL/6 bzw. allogenen BALB/c nTreg-Zellen kokultiviert wurden, wodurch Unterschiede in der suppressiven Aktivität von nTreg-Zellen der verwendeten Mausstämmen als Grund für diese Ergebnisse ausgeschlossen werden konnten. Tresp- und allogene nTreg-Zellen werden in einem solchen Ansatz allerdings durch die Interaktion mit unterschiedlichen Stimulatorzellen unter den „mixed APCs“ aktiviert (BALB/c T-Zellen mit C57BL/6 APCs; C57BL/6 T-Zellen mit BALB/c APCs). Vorausgesetzt, die suppressive Wirkung von nTreg-Zellen wird nicht direkt, sondern indirekt über die APCs vermittelt, könnte dies eine mögliche Erklärung für die fehlende Suppression durch allogene nTreg-Zellen darstellen. Die Frage der Beteiligung von APCs an der Suppression durch nTreg-Zellen wird bis heute kontrovers diskutiert. So konnten Tang et al.

in vivo durch intravitale Mikroskopie zeigen, dass es keine dauerhafte Bindung zwischen nTreg- und Tresp-Zellen gibt. Dagegen wurde eine stabile Verbindung zwischen nTreg-Zellen und DCs detektiert, die der Interaktion von Tresp-Zellen und DCs vorausging (178). Außerdem konnten Wing et al. zeigen, dass *in vitro* die CD80/CD86 Expression auf DCs durch die Interaktion mit CTLA-4 auf den nTreg-Zellen herunterreguliert wird (110). Diese Beobachtungen legen nahe, dass nTreg-Zellen die APCs „umprogrammieren“, wodurch diese nicht mehr effektiv mit Tresp-Zellen interagieren und sie nicht mehr suffizient stimulieren. Andererseits gibt es mehrere *in vitro* Studien die zeigen, dass APCs nicht zwingend notwendig für die suppressive Wirkung von nTreg-Zellen sind. So konnte die Proliferation von Tresp-Zellen durch kokultivierte nTreg-Zellen supprimiert werden, wenn diese durch anti-CD3/anti-CD28 gebundenen Beads (102, 174) in Abwesenheit von APCs stimuliert wurden (104, 121). Auch nach Fixierung von APCs mit Paraformaldehyd (d.h. Umwandlung von membranvermittelten Signale ist nicht mehr möglich) blieb die suppressive Wirkung von nTreg-Zellen aufrechterhalten (105). Sollten APCs jedoch trotzdem Ziele der nTreg-Suppression sein, so könnte dies in der MLR unter der Verwendung von mixed APCs bedeuten, dass allogene nTreg-Zellen die „falschen“ APCs abschalten, nämlich diejenigen durch die sie selbst allogen aktiviert werden (syngen zu den Tresp-Zellen), während sie die Tresp-stimulierenden APCs (syngen zu den nTreg-Zellen) unberührt ließen. Hierdurch würde ihre suppressive Wirkung ins Leere laufen. Um dies auszuschließen wurde der Ansatz dahingehend verändert, dass APCs verwendet wurden, die sowohl von Tresp- als auch von nTreg-Zellen als „allogen“ angesehen werden. Dies ist sowohl bei APCs aus F1 Tieren der beiden Elternstämme, als auch bei APCs eines Drittpenderstamms (DBA/1) der Fall. Eine durch nTreg-Zellen hervorgerufene Veränderung der Funktionalität von APCs würde damit sowohl durch autologe als auch durch allogene nTreg-Zellen hervorgerufen werden. Jedoch konnten nTreg-Zellen auch in diesen Testsystemen keine Inhibition der Proliferation von allophenen Tresp-Zellen (allogen zu den nTreg) bewirken. Durch systematische Variation von Tresp- und nTreg-Zellen aus verschiedenen MHC-differenten Mäusstämmen konnte in allen Kombinationen bestätigt werden, dass jeweils nur MHC-idente nTreg-Zellen suppressiv wirken. Dadurch wurde auch ausgeschlossen, dass generelle Unterschiede in der suppressiven Kapazität von nTreg-Zellen der verschiedenen Mäusstämmen für diese Beobachtung verantwortlich sind. In der Summe konnten wir aus diesen Ergebnissen schließen, dass APCs in der nTreg-vermittelten Suppression *in vitro* nur eine untergeordnete Rolle spielen und nicht für die verminderte Suppression allophenen Tresp-Zellen verantwortlich sind.

Ein Grund für die fehlende suppressive Aktivität von allophenen nTreg-Zellen könnte ihre frühe Eliminierung durch alloreaktive Tresp-Zellen sein. In der MLR unter Verwendung von

CD4⁺ und CD8⁺ Tresp-Zellen kommt es zur präferentiellen Expansion alloreaktiver CTLs und in Kokulturen von CD8⁺ Tresp-Zellen mit allogenen nTreg-Zellen konnte, im Vergleich zu Kulturen mit Tresp-Zellen alleine, eine verstärkte Expansion der CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass CD8⁺ Tresp-Zellen sowohl die APCs, als auch die allogenen nTreg-Zellen über ihre jeweiligen MHC-Klasse I Moleküle als fremd erkannten und somit verstärkt stimuliert wurden. Deshalb stellte sich die Frage, ob diese CD8⁺ Tresp-Zellen allogene nTreg-Zellen über zytotoxische Mechanismen aus der Kultur eliminieren. Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurden in verschiedenen Ansätzen sowohl CD4⁺ und CD8⁺ als auch CD4⁺ Tresp-Zellen alleine eingesetzt und die Persistenz der nTreg-Zellen überprüft. In beiden Ansätzen konnten auch nach mehreren Tagen noch lebende allogene nTreg-Zellen nachgewiesen werden. Somit ist die Zerstörung allogener nTreg-Zellen durch CTLs als Erklärung für die verminderte suppressive Aktivität in diesen Ansätzen unwahrscheinlich.

Neben der Vitalität wurde auch das Proliferationsverhalten und somit das Ausmaß der Stimulation von allogenen nTreg-Zellen überprüft. Dazu wurden nicht nur CD4⁺ Tresp-Zellen, sondern auch nTreg-Zellen CFSE markiert. Interessanterweise konnte hierdurch eine sehr starke Proliferation der nicht-suppressiven allogenen nTreg-Zellen nachgewiesen werden (ca. 80% der Zellen hatten nach sechs Tagen mindestens einen Zellzyklus durchlaufen), wohingegen autologe nTreg-Zellen nur eine geringe Proliferation aufwiesen. Ein Hauptcharakteristikum von nTreg-Zellen ist ihre Anergie *in vitro*, d.h. ihre hypoproliferative Antwort auf herkömmliche T-Zell-Stimuli (76, 99). Erst in Anwesenheit hoher Menge an Zytokinen, wie z.B. IL-2, lassen sie sich zur Expansion anregen (95, 100-102). Verschiedene Studien zeigten, dass der Verlust des anergen Status von nTreg-Zellen nach Kostimulation mit IL-2 und/oder anti-CD28 Antikörpern mit einem Verlust der suppressiven Funktion einher geht (75, 104). Da in unserem Ansatz Tresp-Zellen aufgrund ihrer Stimulation und Proliferation dauerhaft IL-2 sezernieren, könnte dies eine mögliche Erklärung für fehlende suppressive Aktivität von allogenen nTreg-Zellen sein. Die Arbeitsgruppe um Ethan Shevach zeigte allerdings, dass die Gabe von exogenem IL-2 die nTreg-Zellen zwar zur Proliferation befähigt, jedoch die IL-2 mRNA in Tresp-Zellen trotzdem stark unterdrückt wird. Dies stimmt mit eigenen Beobachtungen überein, dass nTreg-Zellen trotz Proliferation ihre suppressive Wirkung beibehalten (100, 171). Zudem wurde von Shevach gezeigt, dass nTreg-Zellen neben der Stimulation über ihren TCR zusätzlich IL-2 von Tresp-Zellen benötigen um ihre suppressive Aktivität auszuüben und exogenes IL-2 für ihr Überleben erforderlich ist (96, 100). Aus der ausgeprägten Proliferation allogener nTreg-Zellen in der MLR lassen sich mehrere Schlüsse ableiten. Erstens, dass die nTreg-Zellen ausreichend durch allogene APCs stimuliert wurden und somit ihre suppressiven Effektormechanismen aktiviert haben sollten. Zweitens, dass sie durch CTLs nicht frühzeitig eliminiert wurden und dass sie

ausreichend mit Kostimulanzen und Zytokinen für ihr Überleben und ihre Proliferation versorgt wurden (u.a. von den kokultivierten Tresp-Zellen). Dies bedeutet aber auch, dass zumindest zu Beginn der Stimulation sowohl autologe als auch allogene nTreg-Zellen die Möglichkeit hatten, suppressive Aktivität auszuüben. Die fehlende Suppression allogener Tresp-Zellen durch nTreg-Zellen scheint deshalb darauf hinzuweisen, dass die Interaktion zwischen nTreg-Zellen und MHC-differenten Tresp-Zellen gestört ist.

Die stark ausgeprägte Expression von CD25 auf nTreg-Zellen wird immer wieder als möglicher Suppressionsmechanismus der nTreg-Zellen erwähnt. So wird postuliert, dass nTreg-Zellen über den hochaffinen IL-2 Rezeptor einen Großteil des verfügbaren IL-2 binden, es dadurch zu einem Entzug dieses Zytokins für Tresp-Zellen kommt und diese dadurch in ihrer Proliferation beeinträchtigt werden (75, 129). Die Gruppe um Lenardo zeigte darüber hinaus, dass ein solcher IL-2 Mangel in CD4⁺ T-Zellen Apoptose induziert. Dabei wird nicht die frühe Aktivierung und Proliferation von CD4⁺ Tresp-Zellen beeinträchtigt, sondern die Expression von Akt1 unterdrückt und dadurch das proapoptotische Protein Bad induziert (130). In anderen Studien wurde jedoch bezweifelt, dass der IL-2 Verbrauch durch nTreg-Zellen alleine einen ausreichenden Suppressionsmechanismus darstellt (131-133). So konnten Tran et al. in polyklonalen Suppressionsansätzen zeigen, dass trotz Blockierung des IL-2 Rezeptors (mittels anti-CD25 Antikörpern) die suppressive Wirkung von nTreg-Zellen auf Tresp-Zellen bestehen bleibt und somit der Verbrauch von IL-2 keine gewichtige Rolle im Suppressionsmechanismus der nTreg-Zellen spielen kann (133). Auch in unseren Ansätzen scheint der IL-2 Verbrauch durch nTreg-Zellen nicht ausschlaggebend zu sein, da eine gleichzeitige Proliferation von allogenen nTreg-Zellen und kokultivierten Tresp-Zellen auftrat, d.h. trotz Bindung von IL-2 durch allogene nTreg-Zellen waren die kokultivierten Tresp-Zellen nicht in ihrer Proliferation gehemmt.

CD4⁺ und CD8⁺ Tresp-Zellen reagieren auf eine allogene Stimulation nicht nur mit Proliferation, sondern auch mit der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-2, IFN- γ oder TNF, die auch in der akuten GvHD eine wichtige Rolle spielen. So führen sie zur Aktivierung von CTLs, welche dann ihrerseits direkt und indirekt (durch zellvermittelte Zytotoxizität und Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen) eine Schädigung von GVHD-Zielorganen verursachen (150). *In vitro* Studien verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, dass nach polyklonaler Stimulation nTreg-Zellen die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-2 und IFN- γ in Tresp-Zellen inhibieren (68, 75, 174). In den durchgeführten Experimenten der vorliegenden Arbeit sezernierten gemischte CD4⁺ und CD8⁺ Tresp-Zellen nach sechstägiger allogener Stimulation ebenfalls IL-2, TNF und IFN- γ . Diese Zytokinproduktion war wiederum nur in Anwesenheit von autologen nTreg-Zellen unterdrückt, während allogene nTreg-Zellen keine suppressive Wirkung zeigten. Dabei ergab

die separate Analyse der CD4⁺ und CD8⁺ Tresp-Zellen, dass CD8⁺ T-Zellen durch autologe nTreg-Zellen in ihrer Zytokinsekretion vollständig inhibiert wurden, während in CD4⁺ Tresp-Zellen zwar die IL-2 und IFN- γ , nicht aber die TNF-Produktion unterdrückt wurde. Dies war erstaunlicherweise nicht der Fall wenn CD4⁺ Tresp-Zellen alleine (ohne CD8⁺ T-Zellen) mit autologen nTreg-Zellen kokultiviert wurden. Interessanterweise konnte sowohl für autologe als auch für allogene nTreg-Zellen eine starke Produktion von TNF nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen wurden in der Literatur bisher noch nicht beschrieben und auch über die Funktion von TNF für die Suppression von nTreg-Zellen liegen bisher keine Berichte vor. Zakharova et al. konnten allerdings zeigen, dass TNF-behandelte Makrophagen und DCs geringere Mengen an IL-12p70 produzieren (179). Zudem wurde in Studien von Cope et al. gezeigt, dass eine dreiwöchige Behandlung von adulten Mäusen mit TNF zur Inhibierung der T-Zell-Antwort führt. So konnte *ex vivo* sowohl eine verringerte T-Zell-Proliferation, als auch eine verringerte Produktion von IL-2 und IFN- γ gemessen werden (180).

Mitglieder der TNFR Superfamilie werden immer wieder in Zusammenhang mit nTreg-Zellen und ihrer Funktion genannt. CD137 (4-1BB) wird sowohl auf nTreg-Zellen als auch auf Tresp-Zellen nach Aktivierung exprimiert. CD134 (OX-40) wird von Tresp-Zellen ebenfalls nur nach Stimulation hochreguliert, während nTreg-Zellen diesen Marker konstitutiv exprimieren. Beide Moleküle vermitteln nach Bindung an ihre jeweiligen Liganden (CD134L und CD137L) kostimulatorische Signale an T-Zellen (50, 51). Die Aktivierung über CD134 führt zu einer Aufrechterhaltung der T-Zell-Effektorfunktion, die durch Hochregulierung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-XL ermöglicht wird (181). CD137 verstärkt das Proliferationsvermögen von T-Zellen, steigert die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen und führt ebenfalls zu einer Verlängerung der Lebensdauer aktivierter T-Zellen (182, 183). Durch Blockade der CD137/CD137L und CD134/CD134L Interaktionen konnte in Mäusen eine Reduktion der GvHD-Mortalität erzielt werden (54, 159, 166). Die Analyse der Expression von CD137 und CD134 auf Tresp-Zellen in Kokultur mit autologen oder allogenen nTreg-Zellen wies eine Inhibition der induzierten Expression beider Korezeptoren nur in Anwesenheit von autologen nTreg-Zellen nach. Dagegen exprimierten Tresp-Zellen in Kokultur mit allogenen nTreg-Zellen sowohl CD137 als auch CD134 in hohem Maße, was erneut für die vollständige Stimulation der Tresp-Zellen in Anwesenheit der allogenen nTreg-Population spricht. Autologe nTreg-Zellen zeigten nach sechstägiger Stimulation kaum eine Veränderung der Expression von CD137 und CD134, während die Expression beider kostimulatorischer Moleküle auf nicht-suppressiven allogenen nTreg-Zellen im Verlauf der Kokultur stark anstieg und damit die Aktivierung der nTreg-Population bestätigte. Studien von Vu et al. konnten zeigen, dass die Expression von CD134 weder einen Einfluss auf die Entwicklung noch auf die suppressive Wirkung von nTreg-Zellen hat. Jedoch führte die Stimulation von CD134 auf nTreg-Zellen mittels CD134L tg APCs in Gegenwart von anti-

CD3 zum Verlust der suppressiven Aktivität *in vitro* und *in vivo*. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass solch ein kostimulatorisches Signal über CD134 weder das Proliferationsvermögen noch die Vitalität der nTreg-Zellen beeinflusst, jedoch die FoxP3 Expression negativ reguliert (50). Die erhöhte Expression von CD134 auf allogenen (im Vergleich zu autologen) nTreg-Zellen könnte somit zu einem verstärkten Signal über CD134 führen und dadurch zu einem Verlust der suppressiven Aktivität. Gegen diese Hypothese spricht allerdings die Tatsache, dass es in den allogenen nTreg-Zellen zu keiner Abnahme der FoxP3 Expression kam. Soroosh et al. beschrieben darüber hinaus, dass CD4⁺ T-Zellen nach Antigenstimulation CD134L, das normalerweise nur auf APCs exprimiert wird, hochregulieren können. Sie postulierten, dass der dadurch ermöglichte T-Zell:T-Zell-Kontakt den kostimulatorischen Signalweg von CD134 unterstützt und die Vitalität der CD4⁺ T-Zellen fördert (184). Es wäre also theoretisch möglich, dass CD4⁺ Tresp-Zellen als Folge der allogenen Stimulation CD134L hochregulieren, an CD134 auf allogenen nTreg-Zellen binden und es dadurch zu einem Verlust der suppressiven Aktivität in den allogenen nTreg-Zellen kommt. Auch die CD137 Expression war in nTreg-Zellen nach sechstägiger MLR erhöht. Dabei konnte unter den autologen nTreg-Zellen im Vergleich zu Beginn der Kokultur ein leichter Anstieg der CD137⁺ Zellen detektiert werden, während alle allogenen nTreg-Zellen am Ende der Kultur eine homogen starke Expression von CD137 aufwiesen. Es ist bekannt, dass nTreg-Zellen nach Stimulation CD137 hochregulieren und dass eine Stimulation über CD137 in Gegenwart einer suboptimalen IL-2 Konzentration ihre Expansion fördert (98, 185). Es ist jedoch nicht bekannt, ob eine solche Stimulation in Kokultur mit Tresp-Zellen die suppressive Aktivität von nTreg-Zellen beeinflussen kann. Um diese Gesichtspunkte zu analysieren, wird die Bedeutung der Stimulation von nTreg-Zellen über CD134 und CD137 in zukünftigen Experimenten detaillierter untersucht werden.

Alle bisher diskutierten Ergebnisse zeigen, dass APCs *in vitro* zwar für die Aktivierung und damit die Initiierung der Suppressionsfunktion von nTreg-Zellen in der MLR wichtig sind, als Zielobjekt der Suppression aber eine untergeordnete Rolle spielen. Offensichtlich muss zusätzlich eine direkte Interaktion zwischen nTreg- und Tresp-Zellen stattfinden, wodurch die Suppression der Tresp-Zellen in Gang gesetzt wird. Im Anschluss daran könnte die suppressive Wirkung der nTreg-Zellen auch über lösliche Faktoren wie Zytokine, perizelluläres Adenosin oder cAMP erfolgen. In Studien von Collison et al. wurde erstmals gezeigt, dass IL-35 als löslicher Mediator zur suppressiven Funktion der nTreg-Zellen beitragen kann (128). Eine Defizienz dieses Zytokins in den nTreg-Zellen führt zu einer signifikant reduzierten regulatorischen Aktivität. Jedoch wurden diese Beobachtungen bisher noch von keiner weiteren Gruppe bestätigt. Gegen die Beteiligung von löslichen Mediatoren spricht die Tatsache, dass nTreg-Zellen nicht mehr in der Lage sind die Proliferation von

Tresp-Zellen zu unterdrücken, wenn beide T-Zellpopulationen durch eine semipermeable Membran (Transwellmembran) getrennt sind (75, 104). Allerdings könnte die suppressive Aktivität von nTreg-Zellen über sekretorische Substanzen, wie z.B. Adenosin oder cAMP ablaufen, die über direkten Zellkontakt übertragen werden. Das perizelluläre Adenosin wirkt lokal über den A_{2A} Rezeptor suppressiv auf Tresp-Zellen (115-118), während cAMP direkt über *Gap Junctions* in Tresp-Zellen übertragen wird (114). Wahrscheinlicher erscheint jedoch, dass zellkontaktabhängige Suppressionsmechanismen direkt durch Oberflächenmoleküle wie z.B. CTLA-4 vermittelt werden. CTLA-4 auf nTreg-Zellen induziert die Transkriptionsfaktoren ICER/CREM in Tconv-Zellen, welche mit NFAT einen dominanten inhibitorischen Komplex innerhalb des IL-2 Promotors bilden und somit zur Inhibierung der IL-2 Synthese führen (112, 113).

Die Suppression der alloreaktiven Proliferation und Zytokinproduktion von Tresp-Zellen durch nTreg-Zellen des gleichen Mausstamms erhärtet die Vermutung, dass die MHC-Kompatibilität zwischen Tresp- und nTreg-Zellen eine Rolle spielt für die suppressive Aktivität der nTreg-Zellen. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Tresp- und nTreg-Zellen aus zwei Mausstämmen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund isoliert (DBA/2 und BALB/c), die jedoch den gleichen MHC-Haplotyp exprimieren (H-2^d). Ein Vergleich der MHC-Gensequenzen auf Chromosom 17 beider Mausstämmen ergab nur im Gen H-2Q einen Polymorphismus. Somit ist der MHC der beiden Mausstämmen genetisch weitgehend identisch. In Suppressionsexperimenten unter Verwendung dieser MHC-identen und Mausstamm-differenten nTreg- und Tresp-Zellen wurde eine potente Suppression der Proliferation von Tresp-Zellen detektiert. Hierbei spielte es keine Rolle, ob die T-Zellpopulationen durch mixed APCs oder APCs eines Drittspenderstamms aktiviert wurden. Analog dazu konnte in früheren Suppressionsstudien gezeigt werden, dass nTreg-Zellen nicht in der Lage waren die Proliferation von genetisch identen, aber MHC-differenten Tresp-Zellen zu inhibieren (MLR unter Verwendung von Zellen aus Balb/c und Balb/b Mäusen; P. Hoffmann, J. Ermann & M. Edinger; unveröffentlichte Daten). In ihrer Gesamtheit weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass der MHC-Locus, nicht aber der genetische Hintergrund, für die Suppressionskapazität von nTreg-Zellen von zentraler Bedeutung ist. Hypothetisch wäre denkbar, dass MHC-Moleküle auf Tresp-Zellen direkt von nTreg-Zellen erkannt werden und sich die unterschiedliche Suppressionsaktivität bei MHC-differenten T-Zell-Subpopulationen hierdurch erklärt. LeGuern et al. postulierten, dass humane nTreg-Zellen über ihren TCR an MHC-Klasse II Moleküle auf CD4⁺ Tresp-Zellen binden, welche MHC-Klasse II Peptide von APCs aufgenommen und prozessiert haben (186). Peiser et al. konnten zudem zeigen, dass eine Blockierung von MHC-Klasse II auf aktivierten humanen nTreg-Zellen deren suppressives Potential außer Kraft setzt (187). Murine T-Zellen können

jedoch keine MHC-Klasse II Moleküle exprimieren, da sie aufgrund der Hypermethylierung der Promotorregion III nicht in der Lage sind den MHC-Klasse II Transaktivator (CIITA) zu transkribieren (35, 36). Obwohl der TCR von CD4⁺ Tresp-Zellen bzw. nTreg-Zellen nicht an MHC-Klasse I Moleküle binden sollte, wurde in vorangegangenen Studien die Beteiligung der MHC-Klasse I Moleküle an der selektiven Suppression autologer Tresp-Zellen ausgeschlossen. So wurden MLRs durchgeführt, in denen CD4⁺ Tresp- bzw. nTreg-Zellen aus β 2-Mikroglobulin (β 2M) *knockout* Mäusen eingesetzt wurden. Aufgrund der β 2M-Defizienz (β 2M^{-/-}) sind Zellen aus diesen Tieren nicht in der Lage MHC-Klasse I Moleküle auf der Oberfläche zu exprimieren (188). In Suppressionsassays wurde beobachtet, dass die Proliferation von C57BL/6 β 2M^{-/-} Tresp-Zellen nur durch C57BL/6, nicht aber durch BALB/c nTreg-Zellen unterdrückt wurde. Ebenso waren C57BL/6 β 2M^{-/-} nTreg-Zellen in der Lage C57BL/6 CD4⁺ Tresp-Zellen zu inhibieren. Auch in Abwesenheit der MHC-Klasse I Moleküle auf beiden T-Zellpopulationen konnten nur autologe nTreg-Zellen die Proliferation von CD4⁺ Tresp-Zellen unterdrücken (P. Hoffmann, J. Ermann, M. Edinger; unveröffentlichte Daten). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass trotz des möglichen Einflusses der MHC-Differenz auf die suppressive Aktivität von nTreg-Zellen der MHC selbst nicht direkt an der Erkennung von Tresp- und nTreg-Zellen beteiligt ist. Vielmehr wäre es denkbar, dass in der MHC-Genregion kodierte Membranrezeptoren in die Erkennung und Bindung von Tresp- und nTreg-Zellen involviert sind.

4.2 Schutz vor akuter GvHD erfolgt nur durch autologe nTreg-Zellen

Die GvHD ist eines der Hauptprobleme der allogenen KMT und für die hohe Morbidität und Mortalität dieses Therapieverfahrens verantwortlich. Sie wird durch reife Tconv-Zellen im Transplantat verursacht, die MHC-Klasse I und II Moleküle des Empfängers und/oder darin präsentierte miHA erkennen. Die Stärke der GvHD hängt sowohl vom Grad der MHC-Inkompatibilität und dem genetischen Hintergrund von Spender und Empfänger, als auch von der Anzahl transplantierte Tconv-Zellen ab. Diese gegen Alloantigene gerichtete Immunreaktion der Tconv-Zellen kann u.a. durch nTreg-Zellen unterdrückt werden, die dadurch einen Schutz vor GvHD nach allogener KMT bewirken (74, 161, 162). nTreg-Zellen alleine induzieren keine GvHD (163, 189), unterstützen jedoch die hämatopoetische Rekonstitution und die Entwicklung eines kompletten Donorchimerismus (190, 191). Um einen Schutz vor GvHD zu erhalten, muss der Anteil der nTreg-Zellen an den transplantierten T-Zellen, im Vergleich zum physiologischen Verhältnis, stark erhöht werden.

Hierbei können sowohl frisch isolierte nTreg-Zellen (161), als auch *in vitro* polyklonal (anti-CD3 und IL-2) (162, 192) bzw. durch allogene APCs (74) aktivierte nTreg-Zellen verwendet werden. Ein wichtiger Aspekt der suppressiven Wirkung von nTreg-Zellen ist, dass diese zwar die Expansion von kotransplantierten Tconv-Zellen und die Akkumulation von pro-inflammatorischen Zytokinen unterdrücken, jedoch nicht die initiale Aktivierung von Tconv-Zellen (163). So konnten Edinger et al. zeigen, dass nTreg-Zellen zwar die alloantigenspezifische Expansion von CD8⁺ T-Zellen unterdrücken, aber ihre zytotoxische Wirkung nicht beeinflussen. Da die frühe, exzessive Expansion alloreaktiver T-Zellen eine Voraussetzung für die Entwicklung einer letalen GvHD darstellt, für den GvL-Effekt aber nicht unbedingt erforderlich ist, konnte ein Schutz vor GvHD ohne gleichzeitigen Verlust der GvL-Wirkung beobachtet werden.

In verschiedenen Organtransplantationsstudien wurde gezeigt, dass alloantigenspezifische nTreg-Zellen entscheidend zur Toleranzentwicklung nach Organtransplantation beitragen (90, 193). So wurden in den tierexperimentellen Transplantationsexperimenten von Kingsley et al. (90) Mäuse zuerst mit anti-CD4 Antikörper und allogenen PBMCs vom Typ A behandelt. Nach adoptivem Transfer der auf diese Weise generierten alloantigenspezifischen nTreg-Zellen in eine zweite unbehandelte Empfängermaus konnte diese auf Grund ihrer allospezifischen nTreg-Zellen die Abstoßung eines Hauttransplantats vom Typ A, nicht aber vom Typ B, verhindern. Gleichzeitig wurde in Kontrollansätzen beobachtet, dass nTreg-Zellen von unbehandelten Mäusen des Empfängertyps die Abstoßung des allogenen Hauttransplantats in Empfängertieren nicht verhindern konnten. Hierbei stellt sich die Frage, ob die Induktion einer gegen den Empfänger gerichteten Alloantigenspezifität in nTreg-Zellen auch eine Möglichkeit der Prophylaxe bei der allogenen KMT darstellt und dadurch das Risiko einer GvHD vermindert werden kann. Es ist jedoch zu bedenken, dass bei Organtransplantationen die alloantigengerichtete Immunreaktion des Empfängers gegen definierte Alloantigene auf den Immunzellen des Spenders unterdrückt werden muss. Im Gegensatz dazu richtet sich bei der allogenen KMT die Immunantwort der Spender-T-Zellen gegen bisher nicht vollständig definierte Alloantigene des Empfängers (sowohl auf hämatopoetischen Zellen als auch auf Geweben). Tatsächlich konnte in Studien von Hoffmann et al. gezeigt werden, dass nach allogener KMT der adoptive Transfer von frisch isolierten nTreg-Zellen des Spenderstamms die Expansion von autologen Tconv-Zellen verhindern konnte und damit vor akuter GvHD schützte. Dagegen waren frisch isolierte nTreg-Zellen des Empfängers nicht in der Lage, Tconv-Zellen des Spenders zu inhibieren (161). Diese Beobachtung war relativ unerwartet, da in früheren Publikationen immer wieder behauptet wurde, dass nTreg-Zellen nach der Aktivierung über ihren TCR antigenunabhängig Tconv-Zellen supprimieren (76). Die Aktivierung der nTreg-Zellen des Empfängerstamms müsste in dem KMT-Modell gegeben sein, da genügend Alloantigene in

Form des Knochenmarktransplantats vorhanden sind. Als mögliche Erklärung für den Unterschied der suppressiven Aktivität zwischen nTreg-Zellen des Spender- und Empfängerstamms wurde die MHC-Kompatibilität zwischen nTreg- und Tconv- Zellen diskutiert. Jedoch wäre ein weiterer möglicher Grund für die fehlende suppressive Aktivität von nTreg-Zellen des Empfängers ihre Eliminierung durch Tconv-Zellen des Spenders, welche ja eine alloantigenspezifische Immunreaktion gegen den Empfänger ausüben. Um zumindest eine unzureichende Aktivierung der nTreg-Zellen auszuschließen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein F1-Transplantationsmodell verwendet, in dem letal bestrahlte CB6F1 Rezipienten (H-2^{bd}) mit F1 Knochenmark und elterlichen Tconv- und nTreg-Zellen transplantiert wurden. Folglich konnten T-Zellen beider Elternstämme gleich gut über die jeweils fremden Alloantigene auf den F1 APCs aktiviert werden, während sie aufgrund der bestehenden Toleranz gegenüber ihren eigenen MHC-Allelen weder von bestrahlungsresistenten, noch von rekonstituierten Effektorzellen des Empfängers abgestoßen wurden. Wichtig hierbei war, dass nTreg-Zellen zwei Tage vor Verabreichung der Tconv-Zellen transplantiert wurden und dadurch ihre Aktivierung gewährleistet war. Obwohl in diesem Modell nicht zwingend notwendig, wurden die Empfängertiere vorab konditioniert, um möglichst gleiche Transplantationsbedingungen wie im bisher verwendeten KMT-Modell (C57BL/6→BALB/c) zu haben. Zum einen führt die Bestrahlung mit einer letalen Dosis zu einer Leuko- und Lymphopenie, die Platz schafft für die homeostatische Proliferation der transplantierten T-Zellen, zum anderen induziert die Konditionierung des Empfängers Gewebeschädigungen und dadurch die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wodurch APCs des Empfängers aktiviert werden (150, 154). Die daraus resultierende Präsentation der Alloantigene auf den APCs des Empfängers im Kontext mit kostimulatorischen Molekülen führt zu einer starken Aktivierung und Expansion der transplantierten T-Zellen, wie u.a. Schlomchik et al. in früheren Studien eindrücklich zeigen konnten (194). Zudem postulierten Teshima et al., dass die Expression der MHC-Klasse I und II Moleküle auf Empfänger-APCs und weniger diejenige in GvHD-Zielorganen entscheidend für die Auslösung der GvHD ist (195). Im Gegensatz dazu zeigten Zhang et al., dass durch eine Organ-spezifische Depletion von DCs und Makrophagen im Empfänger die Proliferation und Einwanderung von alloreaktiven CD8⁺ Tconv-Zellen in das jeweilige Organ verhindert werden konnte, wodurch deutlich wurde, dass auch gewebsansässige APCs an der lokalen Aktivierung und Expansion von CD8⁺ T-Zellen beteiligt sind (196). Zusätzlich wurde kürzlich in Studien von Haniffa et al. gezeigt, dass residuelle Makrophagen der Dermis die Aktivität und Expansion vor allem von CD8⁺ Tconv-Zellen und im geringen Maße auch von CD4⁺ Tconv-Zellen induzieren (197). Wie wichtig die Konditionierung und die daraus resultierende Aktivierung der Empfänger APCs ist, konnten auch Nguyen et al. durch intravitale Mikroskopie zeigen (198). In ihren Studien wurden luc⁺ FVB/N (H-2^k) CD4⁺CD25⁺

nTreg-Zellen entweder in bestrahlte allogene BALB/c (H-2^d), oder in autologe FVB/N Rezipienten, oder in unbestrahlte allogene RAG2^{-/-}γC^{-/-} (H-2^d) Tiere transplantiert. Nur in den bestrahlten allogenen Empfängermausen, nicht aber in den anderen Rezipienten, konnte eine Proliferation und Migration von nTreg-Zellen in sekundäre lymphatische Organe detektiert werden.

Unter den von uns gewählten Bedingungen führte die Gabe von Tconv-Zellen des BALB/c Elternstamms zur Auslösung einer letalen GvHD in den CB6F1 Empfängertieren. Dabei erkannten BALB/c Tconv-Zellen den MHC des zweiten Elternstamms (C57BL/6) auf den APCs der Empfängermause, wodurch sie über direkte Alloantigenerkennung (20, 138) aktiviert wurden. Tiere, denen zusätzlich BALB/c nTreg-Zellen transplantiert wurden, überlebten den gesamten Beobachtungszeitraum und zeigten keine Anzeichen einer GvHD. Im Gegensatz hierzu entwickelten alle Tiere, die BALB/c Tconv- und C57BL/6 nTreg-Zellen erhalten hatten, sowohl einen starken Gewichtsverlust, als auch einen klinischen GvHD-Score und verstarben an akuter GvHD. Ähnliche Ergebnisse wurden nach Transplantation von C57BL/6 Tconv-Zellen mit C57BL/6 bzw. BALB/c nTreg-Zellen erzielt, wodurch mausstammspezifische Unterschiede in der suppressiven Aktivität der transplantierten nTreg-Zellen als Ursache für diese Ergebnisse ausgeschlossen werden können. Der signifikante Überlebensvorteil der Mäuse, denen autologe Tconv- und nTreg-Zellen transplantiert wurden, steht im Einklang mit unserer Hypothese, dass nur autologe nTreg-Zellen die Alloreaktivität von Tconv-Zellen unterdrücken können.

Studien von Ermann et al. zeigten, dass das Homing der nTreg-Zellen entscheidend für die protektive Wirkung ist (199). So konnten CD62L⁺ nTreg-Zellen *in vivo* eine bessere suppressive Wirkung gegenüber Tconv-Zellen ausüben als CD62L⁻ nTreg-Zellen. Dies ist verständlich, da CD62L⁺ nTreg-Zellen effizienter in mesenteriale Lymphknoten einwandern können, in denen sie durch APCs aktiviert werden (200). Außerdem konnte in verschiedenen Studien mittels 2-Photonen Laser-Scanning Mikroskopie gezeigt werden, dass nTreg-Zellen in sekundären lymphatischen Organen eine stabile Interaktion zu APCs aufbauen, diese modulieren und dadurch das Priming der Tconv-Zellen verhindern (178, 201). Eine mögliche Ursache für die fehlende Suppression durch allogene nTreg-Zellen könnte eine unterschiedliche Expression von Lymphknotenhomingrezeptoren auf nTreg-Zellen verschiedener Mausstämmen sein. Da sich allerdings die nTreg-Zellen von BALB/c und C57BL/6 Mäusen hinsichtlich ihrer CD62L Expression nicht unterscheiden, erscheint diese Erklärung unwahrscheinlich. Außerdem zeigt die Tatsache, dass nTreg-Zellen der einzelnen Mausstämmen ihre jeweiligen autologen Tconv-Zellen im Transplantationsmodell suffizient inhibieren, dass sie ähnlich gut in Lymphknoten migrieren.

Neben den klassischen GvHD-Zielorganen Darm, Leber und Haut sind auch lymphatische Organe von der GvH-Reaktion betroffen. Alloreaktive Tconv-Zellen können durch den

sogenannten Spender-gegen-Stroma Effekt das Stroma und die Epithelzellen in den lymphatischen Organen, Knochenmark und Thymus zerstören und dadurch die Reifung der Vorläuferzellen behindern (191, 202). So wurde von Garvy et al. gezeigt, dass der Spender-gegen-Stroma Effekt im Knochenmark zum Verlust der B-Zell-Rekonstitution führt (169). Neben diesem Spender-gegen-Stroma Effekt kommt es in dem von uns gewählten F1 Modell durch die Alloantigenerkennung auf F1 Knochenmarkzellen durch elterliche Tconv-Zellen aber auch noch zu einem Spender-gegen-Hämatopoese Effekt, der ansonsten Grundlage des gewünschten GvL-Effekts nach allogener KMT ist, hier aber zur Zerstörung der transplantierten Knochenmarkzellen führen kann. All das ließ es sinnvoll erscheinen, die Zusammensetzung der Lymphozyten in den einzelnen Organen der F1 Empfängertiere näher zu untersuchen. Tiere, die nach Transplantation von allogenen nTreg-Zellen an GvHD erkrankten, zeigten im Gegensatz zu Tieren der nTreg auto-Gruppe in Milz und Knochenmark eine starke Reduktion der Zellzahl. Dies ging einher mit einem vollständigen Verlust der B-Zellreihe, einer Verschiebung des natürlichen CD4:CD8 Verhältnisses (203) in Richtung CD8⁺ T-Zellen und der starken Reduktion von T-Zellen vom CB6F1 Typ, die aus dem transplantierten Knochenmark regenerieren sollten. Diese Befunde legen nahe, dass in diesen Tieren tatsächlich sowohl die lymphatischen Organe von alloreaktiven Tconv-Zellen durch den Spender-gegen-Stroma Effekt, als auch mittransplantierte Knochenmarkzellen durch den Spender-gegen-Hämatopoese Effekt angegriffen wurden. In der Literatur wurde bisher beschrieben, dass nicht nur Tconv-Zellen (203-206), sondern auch nTreg-Zellen über die Interaktion CXCL12 (des Knochenmarkstromas) und CXCR4 (auf nTreg-Zellen) ins Knochenmark einwandern (207). Zudem beschrieben Hoffmann et al., dass der physiologische Anteil an nTreg-Zellen unter den CD4⁺ T-Zellen im Knochenmark wesentlich höher ist als in der Peripherie (161). Da in GvHD-erkrankten Rezipienten der allo nTreg-Gruppe nur Tconv-Zellen im Knochenmark detektiert wurden, stellt sich die Frage, ob allogene nTreg-Zellen unter diesen Bedingungen überhaupt in das Knochenmark einwanderten, oder ob sie dort eventuell von alloreaktiven Tconv-Zellen eliminiert wurden. Da die durchflußzytometrischen Zellanalysen des Knochenmarks von Tieren der nTreg allo-Gruppe erst zum Zeitpunkt ihres Versterbens durchgeführt wurden, kann auf Basis der vorliegenden Daten keine Aussage über die Migration und/oder frühe Expansion der nTreg-Zellen im Knochenmark getroffen werden. In zukünftigen Transplantationsversuchen sollen frühe Knochenmarkzellanalysen Aufschluss über den Verbleib allogener nTreg-Zellen im Knochenmark geben.

Aufgrund der Tatsache, dass nTreg-Zellen im peripheren Blut oder der Milz in sehr geringen Mengen vorliegen, wäre es für den therapeutischen Einsatz von nTreg-Zellen nach allogener KMT von Vorteil, diese vor Transplantation *in vitro* zu expandieren. Hierzu wäre es

wesentlich einfacher nTreg-Zellen aus einem gesunden Drittsponder und damit sozusagen auf Vorrat („off-the-shelf“) zu gewinnen. Dadurch könnten frühzeitig alle für ein zelluläres Therapeutikum notwendigen Qualitätskontrollen durchgeführt werden. Mögliche Quellen für solche Zellen stellen neben Leukaphereseprodukten adulter Spender auch das Nabelschnurblut dar. Untersuchungen zu humanen nTreg-Zellen des Nabelschnurblutes zeigten, dass sie anerg sind, einen ähnlichen Phänotyp wie nTreg-Zellen aus dem peripheren Blut von Erwachsenen aufweisen und in gleicher Weise *in vitro* eine dosisabhängige suppressive Aktivität gegenüber $CD4^+CD25^-$ Tresp-Zellen ausüben (208, 209). Ein wesentlicher Vorteil der nTreg-Zellen innerhalb des Nabelschnurpräparats ist ihre hohe Frequenz und immunologische Naivität, da im embryonalen Stadium noch fast kein adaptives Immunsystem aufgebaut wurde. Die Arbeitsgruppe von B. Blazar, Minnesota, führt derzeit erste klinische Studien zum Einsatz *in vitro* expandierter nTreg-Zellen aus HLA-kompatiblen Nabelschnurblut durch und die Gruppe um Yair Reisner schloss aus tierexperimentellen Studien, dass nTreg-Zellen eines Drittsponderstamms effektiv Toleranz gegen ein allogenes Transplantat hervorrufen können und nTreg-Zellen von Drittspondern deshalb als „off-the-shelf“-Produkt eingesetzt werden könnten (210, 211). In ihrem KMT-Modell wurden Empfängertiere letal bestrahlt, erhielten dann zunächst wieder syngene T-Zellen die danach ein allogenes T-Zell-freies Knochenmarktransplantat abstoßen konnten. Die Abstoßung dieses Knochenmarks durch die Empfänger-T-Zellen konnte durch die gleichzeitige Gabe von frisch isolierten oder *ex vivo* expandierten nTreg-Zellen eines Drittsponderstamms unterdrückt werden, wenn gleichzeitig mit Rapamycin behandelt wurde. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob nach allogener KMT nur nTreg-Zellen des eigentlichen Donorstamms, oder eventuell auch nTreg-Zellen eines Drittsponderstamms die Alloreaktivität der Tconv-Zellen unterdrücken. Hierfür wurde ein KMT-Modell eingesetzt, in dem letal bestrahlte DBA/1 Rezipienten Knochenmark und Tconv-Zellen eines allogenen Spendertieres transplantiert bekamen. Zusätzlich wurden nTreg-Zellen dieses Spenders oder eines Drittsponderstamms kotransplantiert. Der adoptive Transfer von Tconv- und nTreg-Zellen aus BALB/c Mäusen in DBA/1 Rezipienten führte zu einem 100%igen Schutz vor GvHD ohne klinische oder histopathologische Anzeichen einer Erkrankung. Im Unterschied hierzu starben alle Tiere die nTreg-Zellen des Drittsponderstammes erhalten hatten innerhalb von 40 Tagen an der akuten GvHD. Ähnlich gravierende Unterschiede wurden beobachtet, wenn C57BL/6 Tconv-Zellen mit C57BL/6 bzw. BALB/c nTreg-Zellen kotransplantiert wurden, wobei in dieser Transplantationskonstellation selbst autologe nTreg-Zellen keinen vollständigen Schutz vor GvHD aufbauen konnten. Daraus schließen wir, dass die Verwendung von nTreg-Zellen eines Drittsponderstammes zum Schutz vor GvHD klinisch nicht erfolversprechend ist. Der adoptive Transfer von nTreg-Zellen zum Schutz vor GvHD nach allogener KMT ist in mehreren Mausstammkombinationen untersucht worden

(212). Dabei wurden entweder frisch isolierte oder alloantigenspezifisch bzw. polyklonal stimulierte, *in vitro* expandierte nTreg-Zellen verwendet. Die Auslösung der GvHD erfolgte entweder durch T-Zellen aus einer Gesamtmilzpopulation, durch $CD4^+CD25^-$ oder durch $CD4^+/CD8^+$ Tconv-Zellen, wobei zwischen 1×10^5 und 10×10^6 kotransplantierte T-Zell-Subpopulationen eingesetzt wurden. Zudem erfolgte der Transfer entweder zwischen komplett MHC-Klasse I und/oder II differenten Tieren oder zwischen solchen, die nur miHA Unterschiede aufweisen. In der Folge konnten, je nach Modell, Überlebensraten zwischen 40% und 100% erzielt werden. Die in der Summe nicht unerheblichen Unterschiede zwischen den einzelnen KMT-Modellen erschwerten die vergleichende Analyse der protektiven Wirkung ko-transplantierte nTreg-Zellen. Gleichzeitig belegen die Ergebnisse der unterschiedlichen Arbeitsgruppen die Komplexität und Vielzahl der Faktoren, die letztendlich Ausmaß und Verlauf einer GvH-Erkrankung bestimmen.

Im Vergleich zum haploidenten F1-Transplantationsmodell ergaben die durchflußzytometrischen Zellanalysen von DBA/1 Empfängern in unseren Experimenten, dass die Zellzahlen in Tieren mit GvHD (GvHD Kontrollgruppe und nTreg allo-Gruppe) nur in der Milz vermindert waren, nicht aber im Knochenmark. Dies lässt sich durch die MHC-Kompatibilität zwischen den GvHD-induzierenden Tconv-Zellen und den transplantierten Knochenmarkzellen erklären, so dass es hier nur zu einem Spender-gegen-Stroma Effekt, nicht aber zu dem oben beschriebenen Spender-gegen-Hämatopoese Effekt kam. Hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen konnten somit ungehindert anwachsen, expandieren und die Hämatopoese rekonstituieren. Dennoch konnte, wie schon im F1-Modell, eine Störung der B-Zell-Regeneration im Knochenmark beobachtet werden. Die Gründe für den Verlust der B-Zell-Rekonstitution bei GvHD sind bisher nicht im Detail geklärt, in Übereinstimmung mit einer kürzlichen Publikation vermuten wir aber einen Spender-gegen-Stroma Effekt der alloreaktiven $CD8^+$ T-Zellen (169).

Sowohl die klinischen und histopathologischen als auch die zellulären Ergebnisse dieses allogenen KMT-Modells machen deutlich, dass durch den adoptiven Transfer von nTreg-Zellen eines Drittsponderstamms die Alloreaktivität der Tconv-Zellen des Spenderstamm nicht unterdrückt und deshalb eine GvHD nicht verhindert werden kann. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Reisner et al. (210) lassen sich auf wesentliche Unterschiede der Transplantationsmodelle zurückführen. Bei ihren Untersuchungen konzentrierten sich die Autoren auf die Induktion einer Toleranz im Empfänger gegen das Transplantat. Eine solche Toleranzinduktion spielt vor allem bei Transplantationen nach nicht-myeloablativer Konditionierung eine Rolle, da in einem solchen Fall das Immunsystem des Rezipienten nicht, wie in unserem Modell, durch die Bestrahlung eliminiert wird (90). In dieser Situation konnte durch die Gabe von nTreg-Zellen eines Drittsponderstamms die Abstoßung des T-Zell-depletierten Knochenmarktransplantats verhindert werden. Dieser Effekt war allerdings

erst dann deutlich zu sehen, wenn die Tiere zusätzlich mit Rapamycin behandelt wurden. Rapamycin inhibiert durch Komplexbildung mit mTOR die Zytokin-vermittelten Signaltransduktionswege, wodurch die Aktivierung und der Übergang der T-Zelle von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus verhindert wird. Zudem ist in der Literatur beschrieben, dass Rapamycin einen positiven Effekt auf die Toleranzinduktion durch nTreg-Zellen hat, da deren Funktion (im Unterschied zu der von alloreaktiven Tconv-Zellen) durch Rapamycin kaum beeinflusst wird (213). Dies zeigte sich auch in den Untersuchungen von Reisner, in denen weder frisch isolierte, noch voraktivierte nTreg-Zellen eines Drittspenderstamms in Abwesenheit von Rapamycin protektiv waren. Ein weiterer Unterschied zwischen den experimentellen Ansätzen ist, dass Reisner et al. 1×10^6 MACS-angereicherte nTreg-Zellen einsetzten um die Wirkung von $1,5 \times 10^4$ T-Zellen des Empfängers zu inhibieren. Dagegen wurden in dem KMT-Modell der vorliegenden Arbeit hochreine (FACS isolierte) Tconv- und nTreg-Zellen im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Dadurch kann in der vorliegenden Arbeit, nicht jedoch in den Studien von Reisner et al., eine Alloreaktion kontaminierender Drittspender-Tconv-Zellen gegen die Empfänger-T-Zellen ausgeschlossen werden. Aufgrund unserer Ergebnisse muss der Einsatz von frisch isolierten oder *ex vivo* expandierten nTreg-Zellen eines Drittspenders für die Prophylaxe einer GvHD nach allogener KMT sehr kritisch hinterfragt werden.

Sowohl nTreg- als auch Tconv-Zellen können innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach allogener KMT in lymphatischen Organen, wie z.B. der Milz und den peripheren Lymphknoten detektiert werden. Wie von unterschiedlichen Gruppen beschrieben, führt der Kotransfer von nTreg-Zellen zu einer starken Inhibition der Proliferation von Tconv-Zellen in lymphatischen, aber auch nicht-lymphatischen Organen (163, 198). So konnten Edinger et al zeigen, dass 7 Tage nach allogener Knochenmarktransplantation in Gegenwart von nTreg-Zellen die Expansion von Tconv-Zellen in mesenterialen Lymphknoten, der Milz und der Leber bereits stark vermindert war (163). Andererseits konnten Jones et al. in einem haploidenten KMT-Modell zeigen, dass nTreg-Zellen, die zu einem späteren Zeitpunkt als Tconv-Zellen transplantiert wurden, nur einen geringen Schutz vor GvHD aufbauen (192). Zusammen zeigen diese Beobachtungen, dass der Schutz vor GvHD am effektivsten ist, wenn nTreg-Zellen in der Induktionsphase der GvHD wirken. Dies wird auch durch Studien in einem TCR transgenen Diabetes-Modell unterstützt, in dem eine Inhibition der Hochregulation des Homingrezeptors CXCR3 auf $CD4^+$ Tconv-Zellen durch nTreg-Zellen den Austritt der Tconv-Zellen aus den sekundären lymphatischen Organen und die Einwanderung in entzündetes Gewebe verhinderte (214).

Da die zellulären und histopathologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zu einem sehr späten Zeitpunkt nach Transplantation durchgeführt wurden, können sie über die frühe

suppressiv Funktion von allogenen nTreg-Zellen keine Auskunft geben. Damit blieb die Frage zunächst offen, ob allogene nTreg-Zellen nach Transplantation von Beginn an keine suppressive Wirkung gegenüber Tconv-Zellen ausüben, oder ob sie anfänglich inhibitorisch wirken und erst im Laufe der Zeit ihre protektive Wirkung verlieren. Um diese Frage zu klären wurde die Expansion und Migration von GvHD-induzierenden Tconv-Zellen unmittelbar nach Transplantation mit Hilfe des nicht-invasiven Verfahrens des *in vivo* Biolumineszenz Imagings (BLI) verfolgt. BLI basiert auf der chemischen Reaktion des Enzyms Luziferase, das unter Verbrauch von Sauerstoff und ATP das Substrat Luziferin decarboxyliert und dabei Lichtquanten emittiert. Diese Photonen durchdringen biologisches Gewebe und können außerhalb des Körpers von einer Schwachlichtkamera gemessen werden (215). Das BLI-Verfahren wurde u.a. in syngen und allogenen murinen Tumormodellen verwendet, um die Migration, Organinfiltration und Proliferation von Tumorzellen zu untersuchen. Dabei konnten sowohl die Auswirkungen von unterschiedlichen Therapieansätzen (Chemo-, Radio- und Zelltherapie) als auch das Auftreten eines möglichen Rezidivs zu unterschiedlichen Zeitpunkten in ein und demselben Tier über die Zeit beobachtet werden (216). Diese Mehrfachuntersuchungen im lebenden Tier ermöglichen somit eine deutliche Reduktion der Anzahl an Versuchstieren, da nicht zu jedem Untersuchungszeitpunkt eine Kohorte von Versuchstieren euthanasiert werden muss. Das BLI-Verfahren ist ein relativ einfach zu handhabendes und sehr sensitives Verfahren, da im erwähnten Tumormodell weniger als 1×10^4 Tumorzellen in unterschiedlichen Organen wie Lunge, Leber oder Milz detektiert werden konnten. Somit bot das BLI-Verfahren im allogenen KMT-Modell der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit, frühe Einblicke in das Überleben, die Expansion und Migration von Tconv-Zellen im lebenden Tier zu erhalten und dadurch Aussagen über die suppressive Wirkung von allogenen nTreg-Zellen zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach allogener KMT machen zu können. Für diese Untersuchungen wurden $CD4^+/CD8^+$ Tconv-Zellen aus einer transgenen FVB/N-luc Maus (H-2^q) isoliert, die das Reporter-Gen Luziferase in allen hämatopoetischen Zellen exprimiert. Der Vergleich der Photonenemission von luc⁺ Tconv-Zellen der nTreg auto- und nTreg allo-Gruppe zeigte einen deutlichen Unterschied in der Suppression der Expansion von Tconv-Zellen durch autologe und allogene nTreg-Zellen von Beginn an. In Anwesenheit von allogenen nTreg-Zellen wurde eine ungehinderte und rasche Expansion und Migration der Tconv-Zellen in Milz, Lymphknoten, Gastrointestinaltrakt und Lunge beobachtet. Nach dem adoptiven Transfer von autologen nTreg-Zellen konnte dagegen ein gleichbleibend niedriges Niveau der Photonenabgabe pro Maus detektiert werden. Diese Daten bestätigen die frühe Suppression der Expansion von Tconv-Zellen durch autologe nTreg-Zellen in den lymphatischen Organen, während allogene nTreg-Zellen weder zu einem sehr frühen Zeitpunkt noch spät nach Transplantation die Expansion der Tconv-Zellen unterdrücken.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die MHC-Kompatibilität zwischen Tconv- und nTreg-Zellen für den effizienten Schutz vor GvHD nach allogener KMT von entscheidender Bedeutung ist. Weder *in vitro* noch *in vivo* konnten nTreg-Zellen alloreaktive Tconv-Zellen über MHC-Grenzen hinweg effizient supprimieren.

5 Zusammenfassung

Tierexperimentelle Studien von Hoffmann et al. zeigten, dass der adoptive Transfer von frisch isolierten nTreg-Zellen des Spenders im komplett MHC-differenten KMT-Modell die GvHD-induzierenden alloreaktiven Tconv-Zellen unterdrückt und die Tiere dadurch vor letaler GvHD schützt. Dagegen konnten unter gleichen Bedingungen die nTreg-Zellen des Empfängerstamms keinen Schutz vor GvHD aufbauen. Deshalb wurde u.a. vermutet, dass nTreg-Zellen alloreaktive Tconv-Zellen eines MHC-differenten Mausstamms nur unzureichend supprimieren. Im Rahmen dieser Dissertation konnte diese Vermutung durch detaillierte *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen bestätigt werden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die suppressive Aktivität von nTreg-Zellen auf die Proliferation und Zytokinproduktion von autologen und allogenen Tresp-Zellen nach polyklonaler und allogener Stimulation untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass nTreg-Zellen nach polyklonaler Stimulation sowohl autologe als auch allogene Tresp-Zellen inhibieren können und dass die Stärke der TCR-vermittelten Stimulation keinen Einfluss auf die suppressive Aktivität von nTreg-Zellen verschiedener Spenderstämme hat. Wurden die beteiligten T-Zellpopulationen jedoch allogenen durch MHC-differente APCs in MLRs stimuliert, so konnten nTreg-Zellen nur autologe Tresp-Zellen an der Hochregulation kostimulatorischer Moleküle (CD134 und CD137) hindern und in ihrer Proliferation und Zytokinproduktion inhibieren, wohingegen allogene Tresp-Zellen nicht supprimiert wurden. Durch systematische Variation der eingesetzten APCs, Treg- und Tresp-Zellen wurde nachgewiesen, dass dies nicht auf mausstammspezifische Unterschiede in der Suppressionskapazität der Treg-Zellpopulationen zurückzuführen war, sondern tatsächlich auf der exklusiven Suppression MHC-identer, nicht jedoch MHC-differenten Tresp-Zellen durch aktivierte nTreg-Zellen. Durch Verwendung von APCs der F1 Generation MHC-differenten Elternstämme und Verwendung von APCs von Drittspendern wurde ausgeschlossen, dass die räumliche Separation der Aktivierung von allogenen Treg- und Tresp-Zellen für diese Unterschiede verantwortlich war. Durch Verwendung von Mäusen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund aber identischem MHC wurde nachgewiesen, dass vermutlich Genprodukte des MHC-Locus für die differentielle Sensitivität von Tresp-Zellen für die von Treg-Zellen-vermittelte Suppression verantwortlich sind, da nTreg-Zellen MHC-identer, nicht aber MHC-differenten Tresp-Zellen unterdrücken, selbst wenn die Hintergrundgene verschieden sind. Wahrscheinlich ist hierfür nicht der MHC selbst verantwortlich, sondern andere Gene die im Rahmen der Auskreuzung der Mausstämme

mitvererbt wurden. Die Identifizierung dieser Genprodukte ist Ziel zukünftiger Arbeiten der Arbeitsgruppe.

Im zweiten Teil der vorgelegten Arbeit wurden diese *in vitro* Beobachtungen in Mausmodellen der akuten GvHD überprüft. Hierfür wurde zum einen ein haploidentes F1-Transplantationsmodell verwendet, in dem letal bestrahlte CB6F1 Rezipienten (H-2^{bd}) ihr eigenes Knochenmark und elterliche Tconv- und nTreg-Zellen transplantiert bekamen. Dadurch war gewährleistet, dass weder nTreg-Zellen noch Tconv-Zellen abgestoßen werden können und die T-Zell-Subpopulationen beider Elternstämme gleichermaßen durch Empfänger-APCs aktiviert werden. Dies war insofern wichtig, als nTreg-Zellen nur nach ihrer eigenen Stimulation suppressiv wirken. Zum zweiten wurde ein komplett MHC-differentes KMT-Modell eingesetzt und untersucht, ob allogene nTreg-Zellen eines Drittspenderstamms vor GvHD schützen. In beiden KMT-Modellen konnte nur der adoptive Transfer von nTreg-Zellen des GvHD auslösenden Mausstamms vor letaler GvHD schützen, während nTreg-Zellen MHC-differenten Mäuse (MHC-different zum Empfänger und den GvHD-auslösenden Tconv-Zellen) keinen Schutz boten. Der verminderte Schutz vor akuter GvHD durch allogene nTreg-Zellen konnte sowohl klinisch (Gewichtsverlauf, klinischer GvHD-Score und Überleben) als auch durch histopathologische und zelluläre Untersuchungen bestätigt werden. Um die räumliche und zeitliche Verteilung der GvHD-induzierenden Tconv-Zellen im lebenden Tier zu untersuchen, wurde das nicht-invasive *in vivo* Biolumineszenz Imaging-Verfahren (BLI) angewandt. Durch Kotransplantation von autologen nTreg-Zellen wurde die frühe Expansion der alloreaktiven Tconv-Zellen in lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen stark vermindert, während nTreg-Zellen eines Drittspenderstamms nicht in der Lage waren, die rapide Expansion und Migration von alloreaktiven Tconv-Zellen in GvHD Zielorgane zu supprimieren.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die MHC-Kompatibilität zwischen Tconv- und nTreg-Zellen für einen effizienten Schutz vor letaler GvHD nach allogener KMT von entscheidender Bedeutung ist und dass die in der Literatur bisweilen diskutierte (und z.Z. in einer ersten klinischen Studie getestete) Verwendung von nTreg-Zellen eines Drittspenders klinisch wenig erfolgversprechend erscheint.

Ziel zukünftiger Studien ist primär die Identifizierung der diesen Beobachtungen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen. Hierfür wurde begonnen den MHC-Locus unterschiedlicher Mausstämme auf potentielle Kandidatengene zu untersuchen. Darüber hinaus ist die Identifizierung der in der GvHD relevanten Suppressionsmechanismen zentrales Ziel zukünftiger Experimente.

6 Literatur

1. Stroncek, D.F., M.E. Clay, M.L. Petzoldt, J. Smith, W. Jaszcz, F.B. Oldham, and J. McCullough. 1996. Treatment of normal individuals with granulocyte-colony-stimulating factor: donor experiences and the effects on peripheral blood CD34+ cell counts and on the collection of peripheral blood stem cells. *Transfusion* 36:601-610.
2. Bensinger, W.I., and R. Storb. 2001. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Rev Clin Exp Hematol* 5:67-86.
3. Link, H., L. Arseniev, O. Bahre, J.G. Kadar, H. Diedrich, and H. Poliwoda. 1996. Transplantation of allogeneic CD34+ blood cells. *Blood* 87:4903-4909.
4. Cohena, Y., and A. Nagler. 2003. Hematopoietic stem-cell transplantation using umbilical-cord blood. *Leuk Lymphoma* 44:1287-1299.
5. Hertenstein, B., W. Hampl, D. Bunjes, M. Wiesneth, C. Duncker, U. Koszinowski, H. Heimpel, R. Arnold, and T. Mertens. 1995. In vivo/ex vivo T cell depletion for GVHD prophylaxis influences onset and course of active cytomegalovirus infection and disease after BMT. *Bone Marrow Transplant* 15:387-393.
6. Martino, R., M. Subira, M. Rovira, C. Solano, L. Vazquez, G.F. Sanz, A. Urbano-Ispizua, S. Brunet, and R. De la Camara. 2002. Invasive fungal infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: incidence and risk factors in 395 patients. *Br J Haematol* 116:475-482.
7. Gratwohl, A., R. Brand, J. Apperley, A. Biezen Av, G. Bandini, A. Devergie, A. Schattenberg, F. Frassoni, C. Guglielmi, S. Iacobelli, M. Michallet, H.J. Kolb, T. Ruutu, and D. Niederwieser. 2002. Graft-versus-host disease and outcome in HLA-identical sibling transplantations for chronic myeloid leukemia. *Blood* 100:3877-3886.
8. Ferrara, J.L., J.E. Levine, P. Reddy, and E. Holler. 2009. Graft-versus-host disease. *Lancet* 373:1550-1561.
9. Vogelsang, G.B., L. Lee, and D.M. Bensen-Kennedy. 2003. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med* 54:29-52.

10. Abbas, A.K., and C.A. Janeway, Jr. 2000. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell* 100:129-138.
11. Delves, P.J., and I.M. Roitt. 2000. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343:37-49.
12. Delves, P.J., and I.M. Roitt. 2000. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 343:108-117.
13. Janeway, C.A., A.V. Chervonsky, and D. Sant'Angelo. 1997. T-cell receptors: is the repertoire inherently MHC-specific? *Curr Biol* 7:R299-300.
14. Mosmann, T.R. 1992. T lymphocyte subsets, cytokines, and effector functions. *Ann N Y Acad Sci* 664:89-92.
15. Nikolich-Zugich, J., M.K. Slifka, and I. Messaoudi. 2004. The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol* 4:123-132.
16. Janeway, C.A., Jr. 1998. A tale of two T cells. *Immunity* 8:391-394.
17. Margulies, D.H., G.A. Evans, L. Flaherty, and J.G. Seidman. 1982. H-2-like genes in the Tla region of mouse chromosome 17. *Nature* 295:168-170.
18. Breuning, M.H., E.M. van den Berg-Loonen, L.F. Bernini, J.B. Bijlsma, E. van Loghem, P. Meera Khan, and L.E. Nijenhuis. 1977. Localization of HLA on the short arm of chromosome 6. *Hum Genet* 37:131-139.
19. Klein, J., and A. Sato. 2000. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med* 343:702-709.
20. Archbold, J.K., L.K. Ely, L. Kjer-Nielsen, S.R. Burrows, J. Rossjohn, J. McCluskey, and W.A. Macdonald. 2008. T cell allorecognition and MHC restriction--A case of Jekyll and Hyde? *Mol Immunol* 45:583-598.
21. Little, A.M., and P. Parham. 1999. Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules. *Rev Immunogenet* 1:105-123.
22. York, I.A., and K.L. Rock. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14:369-396.

23. Robinson, J., M.J. Waller, P. Parham, N. de Groot, R. Bontrop, L.J. Kennedy, P. Stoeckl, and S.G. Marsh. 2003. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Res* 31:311-314.
24. Hammer, G.E., F. Gonzalez, M. Champsaur, D. Cado, and N. Shastri. 2006. The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat Immunol* 7:103-112.
25. Rock, K.L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A.L. Goldberg. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78:761-771.
26. Shastri, N., S. Schwab, and T. Serwold. 2002. Producing nature's gene-chips: the generation of peptides for display by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 20:463-493.
27. Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329:512-518.
28. Bjorkman, P.J., M.A. Saper, B. Samraoui, W.S. Bennett, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-512.
29. Guo, H.C., T.S. Jardetzky, T.P. Garrett, W.S. Lane, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1992. Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature* 360:364-366.
30. Madden, D.R., J.C. Gorga, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1992. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* 70:1035-1048.
31. Marsh, S.G., E.D. Albert, W.F. Bodmer, R.E. Bontrop, B. Dupont, H.A. Erlich, D.E. Geraghty, J.A. Hansen, C.K. Hurley, B. Mach, W.R. Mayr, P. Parham, E.W. Petersdorf, T. Sasazuki, G.M. Schreuder, J.L. Strominger, A. Svejgaard, P.I. Terasaki, and J. Trowsdale. 2005. Nomenclature for Factors of the HLA System, 2004. *Hum Immunol* 66:571-636.
32. Engelhard, V.H. 1994. Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 12:181-207.

33. Heath, W.R., and F.R. Carbone. 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1:126-134.
34. Stern, L.J., J.H. Brown, T.S. Jardetzky, J.C. Gorga, R.G. Urban, J.L. Strominger, and D.C. Wiley. 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368:215-221.
35. Chang, C.H., S.C. Hong, C.C. Hughes, C.A. Janeway, Jr., and R.A. Flavell. 1995. CIITA activates the expression of MHC class II genes in mouse T cells. *Int Immunol* 7:1515-1518.
36. Holling, T.M., E. Schooten, and P.J. van Den Elsen. 2004. Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: of mice and men. *Hum Immunol* 65:282-290.
37. Nel, A.E. 2002. T-cell activation through the antigen receptor. Part 1: signaling components, signaling pathways, and signal integration at the T-cell antigen receptor synapse. *J Allergy Clin Immunol* 109:758-770.
38. Anton van der Merwe, P., S.J. Davis, A.S. Shaw, and M.L. Dustin. 2000. Cytoskeletal polarization and redistribution of cell-surface molecules during T cell antigen recognition. *Semin Immunol* 12:5-21.
39. Macian, F., C. Lopez-Rodriguez, and A. Rao. 2001. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20:2476-2489.
40. Minami, Y., T. Kono, T. Miyazaki, and T. Taniguchi. 1993. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu Rev Immunol* 11:245-268.
41. Hoyer, K.K., H. Dooms, L. Barron, and A.K. Abbas. 2008. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol Rev* 226:19-28.
42. Rudensky, A.Y., M. Gavin, and Y. Zheng. 2006. FOXP3 and NFAT: partners in tolerance. *Cell* 126:253-256.
43. Sharpe, A.H., and G.J. Freeman. 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2:116-126.
44. Saito, T., and S. Yamasaki. 2003. Negative feedback of T cell activation through inhibitory adapters and costimulatory receptors. *Immunol Rev* 192:143-160.

45. Jenkins, M.K., P.S. Taylor, S.D. Norton, and K.B. Urdahl. 1991. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 147:2461-2466.
46. Salomon, B., and J.A. Bluestone. 2001. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 19:225-252.
47. Walunas, T.L., C.Y. Bakker, and J.A. Bluestone. 1996. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 183:2541-2550.
48. Egen, J.G., M.S. Kuhns, and J.P. Allison. 2002. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat Immunol* 3:611-618.
49. Yamada, A., A.D. Salama, and M.H. Sayegh. 2002. The role of novel T cell costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *J Am Soc Nephrol* 13:559-575.
50. Vu, M.D., X. Xiao, W. Gao, N. Degauque, M. Chen, A. Kroemer, N. Killeen, N. Ishii, and X. Chang Li. 2007. OX40 costimulation turns off Foxp3⁺ Tregs. *Blood* 110:2501-2510.
51. Clarkson, M.R., and M.H. Sayegh. 2005. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Transplantation* 80:555-563.
52. Sayegh, M.H., and L.A. Turka. 1995. T cell costimulatory pathways: promising novel targets for immunosuppression and tolerance induction. *J Am Soc Nephrol* 6:1143-1150.
53. Sho, M., S.E. Sandner, N. Najafian, A.D. Salama, V. Dong, A. Yamada, K. Kishimoto, H. Harada, I. Schmitt, and M.H. Sayegh. 2002. New insights into the interactions between T-cell costimulatory blockade and conventional immunosuppressive drugs. *Ann Surg* 236:667-675.
54. Blazar, B.R., B.S. Kwon, A. Panoskaltsis-Mortari, K.B. Kwak, J.J. Peschon, and P.A. Taylor. 2001. Ligation of 4-1BB (CDw137) regulates graft-versus-host disease, graft-versus-leukemia, and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Immunol* 166:3174-3183.
55. Weinberg, A.D. 2002. OX40: targeted immunotherapy--implications for tempering autoimmunity and enhancing vaccines. *Trends Immunol* 23:102-109.

56. Chen, Z.M., M.J. O'Shaughnessy, I. Gramaglia, A. Panoskaltsis-Mortari, W.J. Murphy, S. Narula, M.G. Roncarolo, and B.R. Blazar. 2003. IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4+CD25- T cells to acquire regulatory cell function. *Blood* 101:5076-5083.
57. Cortesini, R., J. LeMaout, R. Ciubotariu, and N.S. Cortesini. 2001. CD8+CD28- T suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting cell-mediated suppression of Th reactivity. *Immunol Rev* 182:201-206.
58. Kapp, J.A., K. Honjo, L.M. Kapp, X. Xu, A. Cozier, and R.P. Bucy. 2006. TCR transgenic CD8+ T cells activated in the presence of TGFbeta express FoxP3 and mediate linked suppression of primary immune responses and cardiac allograft rejection. *Int Immunol* 18:1549-1562.
59. Kapp, J.A., and R.P. Bucy. 2008. CD8+ suppressor T cells resurrected. *Hum Immunol* 69:715-720.
60. Arrenberg, P., R. Halder, and V. Kumar. 2009. Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J Cell Physiol* 218:246-250.
61. Zhang, Z.X., L. Yang, K.J. Young, B. DuTemple, and L. Zhang. 2000. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 6:782-789.
62. Hayday, A., and R. Tigelaar. 2003. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* 3:233-242.
63. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
64. Roncarolo, M.G., M. Battaglia, and S. Gregori. 2003. The role of interleukin 10 in the control of autoimmunity. *J Autoimmun* 20:269-272.
65. Levings, M.K., R. Bacchetta, U. Schulz, and M.G. Roncarolo. 2002. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 129:263-276.
66. Weiner, H.L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182:207-214.

67. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
68. Stephens, L.A., C. Mottet, D. Mason, and F. Powrie. 2001. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol* 31:1247-1254.
69. Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6:345-352.
70. Shevach, E.M. 2000. Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu Rev Immunol* 18:423-449.
71. Murakami, M., A. Sakamoto, J. Bender, J. Kappler, and P. Marrack. 2002. CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8832-8837.
72. Belkaid, Y., C.A. Piccirillo, S. Mendez, E.M. Shevach, and D.L. Sacks. 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* 420:502-507.
73. Onizuka, S., I. Tawara, J. Shimizu, S. Sakaguchi, T. Fujita, and E. Nakayama. 1999. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59:3128-3133.
74. Cohen, J.L., A. Trenado, D. Vasey, D. Klatzmann, and B.L. Salomon. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 196:401-406.
75. Thornton, A.M., and E.M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188:287-296.
76. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562.
77. Miyara, M., and S. Sakaguchi. 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 13:108-116.

78. Cederbom, L., H. Hall, and F. Ivars. 2000. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 30:1538-1543.
79. Tang, Q., and J.A. Bluestone. 2008. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 9:239-244.
80. Bensinger, S.J., A. Bandeira, M.S. Jordan, A.J. Caton, and T.M. Laufer. 2001. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med* 194:427-438.
81. Lio, C.W., and C.S. Hsieh. 2008. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28:100-111.
82. Fontenot, J.D., J.L. Dooley, A.G. Farr, and A.Y. Rudensky. 2005. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* 202:901-906.
83. Takahama, Y. 2006. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6:127-135.
84. Bennett, C.L., J. Christie, F. Ramsdell, M.E. Brunkow, P.J. Ferguson, L. Whitesell, T.E. Kelly, F.T. Saulsbury, P.F. Chance, and H.D. Ochs. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21.
85. Brunkow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paeper, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27:68-73.
86. Bettelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5138-5143.
87. Wu, Y., M. Borde, V. Heissmeyer, M. Feuerer, A.D. Lapan, J.C. Stroud, D.L. Bates, L. Guo, A. Han, S.F. Ziegler, D. Mathis, C. Benoist, L. Chen, and A. Rao. 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 126:375-387.
88. Zheng, Y., and A.Y. Rudensky. 2007. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 8:457-462.

89. Sansom, D.M., and L.S. Walker. 2006. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunol Rev* 212:131-148.
90. Kingsley, C.I., M. Karim, A.R. Bushell, and K.J. Wood. 2002. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 168:1080-1086.
91. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192:295-302.
92. Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192:303-310.
93. Tang, Q., E.K. Boden, K.J. Henriksen, H. Bour-Jordan, M. Bi, and J.A. Bluestone. 2004. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34:2996-3005.
94. Kataoka, H., S. Takahashi, K. Takase, S. Yamasaki, T. Yokosuka, T. Koike, and T. Saito. 2005. CD25(+)CD4(+) regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4. *Int Immunol* 17:421-427.
95. Levings, M.K., R. Sangregorio, and M.G. Roncarolo. 2001. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 193:1295-1302.
96. Thornton, A.M., C.A. Piccirillo, and E.M. Shevach. 2004. Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol* 34:366-376.
97. Takeda, I., S. Ine, N. Killeen, L.C. Ndhlovu, K. Murata, S. Satomi, K. Sugamura, and N. Ishii. 2004. Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J Immunol* 172:3580-3589.
98. Zhang, P., F. Gao, Q. Wang, X. Wang, F. Zhu, C. Ma, W. Sun, and L. Zhang. 2007. Agonistic anti-4-1BB antibody promotes the expansion of natural regulatory T cells while maintaining Foxp3 expression. *Scand J Immunol* 66:435-440.

99. Piccirillo, C.A., and E.M. Shevach. 2004. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin Immunol* 16:81-88.
100. Thornton, A.M., E.E. Donovan, C.A. Piccirillo, and E.M. Shevach. 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J Immunol* 172:6519-6523.
101. Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A.H. Enk. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193:1285-1294.
102. Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193:1303-1310.
103. Shevach, E.M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2:389-400.
104. Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10:1969-1980.
105. Thornton, A.M., and E.M. Shevach. 2000. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 164:183-190.
106. Fallarino, F., U. Grohmann, K.W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M.L. Belladonna, M.C. Fioretti, M.L. Alegre, and P. Puccetti. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:1206-1212.
107. Fallarino, F., U. Grohmann, S. You, B.C. McGrath, D.R. Cavener, C. Vacca, C. Orabona, R. Bianchi, M.L. Belladonna, C. Volpi, P. Santamaria, M.C. Fioretti, and P. Puccetti. 2006. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 176:6752-6761.
108. Paust, S., L. Lu, N. McCarty, and H. Cantor. 2004. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10398-10403.

109. Lee, G.K., H.J. Park, M. Macleod, P. Chandler, D.H. Munn, and A.L. Mellor. 2002. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 107:452-460.
110. Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2008. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322:271-275.
111. Misra, N., J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M.D. Kazatchkine, and S.V. Kaveri. 2004. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 172:4676-4680.
112. Bodor, J., Z. Fehervari, B. Diamond, and S. Sakaguchi. 2007. ICER/CREM-mediated transcriptional attenuation of IL-2 and its role in suppression by regulatory T cells. *Eur J Immunol* 37:884-895.
113. Bodor, J., Z. Fehervari, B. Diamond, and S. Sakaguchi. 2007. Regulatory T cell-mediated suppression: potential role of ICER. *J Leukoc Biol* 81:161-167.
114. Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M.S. Staege, M. Stassen, H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204:1303-1310.
115. Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M.L. Dell'Acqua, P.M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke, and K. Falk. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110:1225-1232.
116. Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204:1257-1265.
117. Kobie, J.J., P.R. Shah, L. Yang, J.A. Rebhahn, D.J. Fowell, and T.R. Mosmann. 2006. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* 177:6780-6786.
118. Zarek, P.E., C.T. Huang, E.R. Lutz, J. Kowalski, M.R. Horton, J. Linden, C.G. Drake, and J.D. Powell. 2008. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by

- inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 111:251-259.
119. Workman, C.J., and D.A. Vignali. 2005. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol* 174:688-695.
120. Huang, C.T., C.J. Workman, D. Flies, X. Pan, A.L. Marson, G. Zhou, E.L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H.I. Levitsky, J.D. Powell, D.M. Pardoll, C.G. Drake, and D.A. Vignali. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21:503-513.
121. Piccirillo, C.A., and E.M. Shevach. 2001. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 167:1137-1140.
122. Piccirillo, C.A., J.J. Letterio, A.M. Thornton, R.S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara, and E.M. Shevach. 2002. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 196:237-246.
123. Li, M.O., Y.Y. Wan, and R.A. Flavell. 2007. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 26:579-591.
124. Joetham, A., K. Takeda, C. Taube, N. Miyahara, S. Matsubara, T. Koya, Y.H. Rha, A. Dakhama, and E.W. Gelfand. 2007. Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol* 178:1433-1442.
125. Kearley, J., J.E. Barker, D.S. Robinson, and C.M. Lloyd. 2005. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med* 202:1539-1547.
126. Kursar, M., M. Koch, H.W. Mittrucker, G. Nouailles, K. Bonhagen, T. Kamradt, and S.H. Kaufmann. 2007. Cutting Edge: Regulatory T cells prevent efficient clearance of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 178:2661-2665.
127. Asseman, C., S. Mauze, M.W. Leach, R.L. Coffman, and F. Powrie. 1999. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 190:995-1004.

128. Collison, L.W., C.J. Workman, T.T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K.M. Vignali, R. Cross, D. Sehly, R.S. Blumberg, and D.A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566-569.
129. de la Rosa, M., S. Rutz, H. Dorninger, and A. Scheffold. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34:2480-2488.
130. Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M.J. Lenardo. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 8:1353-1362.
131. Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 6:1142-1151.
132. D'Cruz, L.M., and L. Klein. 2005. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* 6:1152-1159.
133. Tran, D.Q., D.D. Glass, G. Uzel, D.A. Darnell, C. Spalding, S.M. Holland, and E.M. Shevach. 2009. Analysis of adhesion molecules, target cells, and role of IL-2 in human FOXP3+ regulatory T cell suppressor function. *J Immunol* 182:2929-2938.
134. McHugh, R.S., M.J. Whitters, C.A. Piccirillo, D.A. Young, E.M. Shevach, M. Collins, and M.C. Byrne. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16:311-323.
135. Gondek, D.C., L.F. Lu, S.A. Quezada, S. Sakaguchi, and R.J. Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174:1783-1786.
136. Zhao, D.M., A.M. Thornton, R.J. DiPaolo, and E.M. Shevach. 2006. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107:3925-3932.
137. Garin, M.I., C.C. Chu, D. Golshayan, E. Cernuda-Morollon, R. Wait, and R.I. Lechler. 2007. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109:2058-2065.
138. Whitelegg, A., and L.D. Barber. 2004. The structural basis of T-cell allorecognition. *Tissue Antigens* 63:101-108.

139. Gould, D.S., and H. Auchincloss, Jr. 1999. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol Today* 20:77-82.
140. Liu, Z., N.S. Braunstein, and N. Suci-Foca. 1992. T cell recognition of allopeptides in context of syngeneic MHC. *J Immunol* 148:35-40.
141. Sherman, L.A., and S. Chattopadhyay. 1993. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 11:385-402.
142. Mutis, T., and E. Goulmy. 2002. Targeting alloreactive T cells to hematopoietic system specific minor histocompatibility antigens for cellular immunotherapy of hematological malignancies after stem cell transplantation. *Ann Hematol* 81 Suppl 2:S38-39.
143. den Haan, J.M., L.M. Meadows, W. Wang, J. Pool, E. Blokland, T.L. Bishop, C. Reinhardus, J. Shabanowitz, R. Offringa, D.F. Hunt, V.H. Engelhard, and E. Goulmy. 1998. The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science* 279:1054-1057.
144. Goulmy, E., R. Schipper, J. Pool, E. Blokland, J.H. Falkenburg, J. Vossen, A. Gratwohl, G.B. Vogelsang, H.C. van Houwelingen, and J.J. van Rood. 1996. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 334:281-285.
145. Maruya, E., H. Saji, S. Seki, Y. Fujii, K. Kato, S. Kai, A. Hiraoka, K. Kawa, Y. Hoshi, K. Ito, S. Yokoyama, and T. Juji. 1998. Evidence that CD31, CD49b, and CD62L are immunodominant minor histocompatibility antigens in HLA identical sibling bone marrow transplants. *Blood* 92:2169-2176.
146. Malarkannan, S., T. Horng, P. Eden, F. Gonzalez, P. Shih, N. Brouwenstijn, H. Klinge, G. Christianson, D. Roopenian, and N. Shastri. 2000. Differences that matter: major cytotoxic T cell-stimulating minor histocompatibility antigens. *Immunity* 13:333-344.
147. Mendoza, L.M., G. Villaflor, P. Eden, D. Roopenian, and N. Shastri. 2001. Distinguishing self from nonself: immunogenicity of the murine H47 locus is determined by a single amino acid substitution in an unusual peptide. *J Immunol* 166:4438-4445.

148. Mommaas, B., J. Kamp, J.W. Drijfhout, N. Beekman, F. Ossendorp, P. Van Veelen, J. Den Haan, E. Goulmy, and T. Mutis. 2002. Identification of a novel HLA-B60-restricted T cell epitope of the minor histocompatibility antigen HA-1 locus. *J Immunol* 169:3131-3136.
149. Perreault, C., J. Jutras, D.C. Roy, J.G. Filep, and S. Brochu. 1996. Identification of an immunodominant mouse minor histocompatibility antigen (MiHA). T cell response to a single dominant MiHA causes graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 98:622-628.
150. Teshima, T., and J.L. Ferrara. 2002. Understanding the alloresponse: new approaches to graft-versus-host disease prevention. *Semin Hematol* 39:15-22.
151. Hill, G.R., J.M. Crawford, K.R. Cooke, Y.S. Brinson, L. Pan, and J.L. Ferrara. 1997. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 90:3204-3213.
152. Hill, G.R., T. Teshima, A. Gerbitz, L. Pan, K.R. Cooke, Y.S. Brinson, J.M. Crawford, and J.L. Ferrara. 1999. Differential roles of IL-1 and TNF-alpha on graft-versus-host disease and graft versus leukemia. *J Clin Invest* 104:459-467.
153. Moser, B., and P. Loetscher. 2001. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2:123-128.
154. Hill, G.R., W. Krenger, and J.L. Ferrara. 1997. The role of cytokines in acute graft-versus-host disease. *Cytokines Cell Mol Ther* 3:257-266.
155. Antin, J.H., and J.L. Ferrara. 1992. Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* 80:2964-2968.
156. Blazar, B.R., P.A. Taylor, P.S. Linsley, and D.A. Valleria. 1994. In vivo blockade of CD28/CTLA4: B7/BB1 interaction with CTLA4-Ig reduces lethal murine graft-versus-host disease across the major histocompatibility complex barrier in mice. *Blood* 83:3815-3825.
157. Ferrara, J.L., E. Holler, and B. Blazar. 1999. Monoclonal antibody and receptor antagonist therapy for GVHD. *Cancer Treat Res* 101:331-368.
158. Blazar, B.R., P.A. Taylor, A. Panoskaltsis-Mortari, J. Buhlman, J. Xu, R.A. Flavell, R. Korngold, R. Noelle, and D.A. Valleria. 1997. Blockade of CD40 ligand-CD40 interaction impairs CD4+ T cell-mediated alloreactivity by inhibiting mature donor T cell expansion and function after bone marrow transplantation. *J Immunol* 158:29-39.

159. Tsukada, N., H. Akiba, T. Kobata, Y. Aizawa, H. Yagita, and K. Okumura. 2000. Blockade of CD134 (OX40)-CD134L interaction ameliorates lethal acute graft-versus-host disease in a murine model of allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 95:2434-2439.
160. Hattori, K., T. Hirano, H. Miyajima, N. Yamakawa, M. Tateno, K. Oshimi, N. Kayagaki, H. Yagita, and K. Okumura. 1998. Differential effects of anti-Fas ligand and anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on acute graft-versus-host disease pathologies. *Blood* 91:4051-4055.
161. Hoffmann, P., J. Ermann, M. Edinger, C.G. Fathman, and S. Strober. 2002. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 196:389-399.
162. Taylor, P.A., C.J. Lees, and B.R. Blazar. 2002. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 99:3493-3499.
163. Edinger, M., P. Hoffmann, J. Ermann, K. Drago, C.G. Fathman, S. Strober, and R.S. Negrin. 2003. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 9:1144-1150.
164. Walker, M.R., D.J. Kasproicz, V.H. Gersuk, A. Benard, M. Van Landeghen, J.H. Buckner, and S.F. Ziegler. 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* 112:1437-1443.
165. Baecher-Allan, C., V. Viglietta, and D.A. Hafler. 2002. Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J Immunol* 169:6210-6217.
166. Blazar, B.R., A.H. Sharpe, A.I. Chen, A. Panoskaltsis-Mortari, C. Lees, H. Akiba, H. Yagita, N. Killeen, and P.A. Taylor. 2003. Ligation of OX40 (CD134) regulates graft-versus-host disease (GVHD) and graft rejection in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Blood* 101:3741-3748.
167. Cooke, K.R., L. Kobzik, T.R. Martin, J. Brewer, J. Delmonte, Jr., J.M. Crawford, and J.L. Ferrara. 1996. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 88:3230-3239.

168. Grass, J.A., T. Wafa, A. Reames, D. Wages, L. Corash, J.L. Ferrara, and L. Lin. 1999. Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by photochemical treatment. *Blood* 93:3140-3147.
169. Garvy, B.A., J.M. Elia, B.L. Hamilton, and R.L. Riley. 1993. Suppression of B-cell development as a result of selective expansion of donor T cells during the minor H antigen graft-versus-host reaction. *Blood* 82:2758-2766.
170. Hoffmann, P., R. Eder, L.A. Kunz-Schughart, R. Andreesen, and M. Edinger. 2004. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25^{high} regulatory T cells. *Blood* 104:895-903.
171. Hoffmann, P., R. Eder, T.J. Boeld, K. Doser, B. Piseshka, R. Andreesen, and M. Edinger. 2006. Only the CD45RA⁺ subpopulation of CD4⁺CD25^{high} T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood* 108:4260-4267.
172. Zheng, Y., S.Z. Josefowicz, A. Kas, T.T. Chu, M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2007. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445:936-940.
173. Baecher-Allan, C., J.A. Brown, G.J. Freeman, and D.A. Hafler. 2001. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167:1245-1253.
174. Ermann, J., V. Szanya, G.S. Ford, V. Paragas, C.G. Fathman, and K. Lejon. 2001. CD4(+)CD25(+) T cells facilitate the induction of T cell anergy. *J Immunol* 167:4271-4275.
175. Baecher-Allan, C., and D.A. Hafler. 2006. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* 212:203-216.
176. Acuto, O., and F. Michel. 2003. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 3:939-951.
177. Collins, A.V., D.W. Brodie, R.J. Gilbert, A. Iaboni, R. Manso-Sancho, B. Walse, D.I. Stuart, P.A. van der Merwe, and S.J. Davis. 2002. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17:201-210.
178. Tang, Q., J.Y. Adams, A.J. Tooley, M. Bi, B.T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R.M. Locksley, M.F. Krummel, and J.A. Bluestone. 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol* 7:83-92.

179. Zakharova, M., and H.K. Ziegler. 2005. Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF- α : inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 175:5024-5033.
180. Cope, A.P., R.S. Liblau, X.D. Yang, M. Congia, C. Laudanna, R.D. Schreiber, L. Probert, G. Kollias, and H.O. McDevitt. 1997. Chronic tumor necrosis factor alters T cell responses by attenuating T cell receptor signaling. *J Exp Med* 185:1573-1584.
181. Rogers, P.R., J. Song, I. Gramaglia, N. Killeen, and M. Croft. 2001. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15:445-455.
182. Tan, J.T., J.K. Whitmire, R. Ahmed, T.C. Pearson, and C.P. Larsen. 1999. 4-1BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J Immunol* 163:4859-4868.
183. Hurtado, J.C., S.H. Kim, K.E. Pollok, Z.H. Lee, and B.S. Kwon. 1995. Potential role of 4-1BB in T cell activation. Comparison with the costimulatory molecule CD28. *J Immunol* 155:3360-3367.
184. Soroosh, P., S. Ine, K. Sugamura, and N. Ishii. 2006. OX40-OX40 ligand interaction through T cell-T cell contact contributes to CD4 T cell longevity. *J Immunol* 176:5975-5987.
185. Elpek, K.G., E.S. Yolcu, D.D. Franke, C. Lacelle, R.H. Schabowsky, and H. Shirwan. 2007. Ex vivo expansion of CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling. *J Immunol* 179:7295-7304.
186. LeGuern, C. 2003. Regulation of T-cell functions by MHC class II self-presentation. *Trends Immunol* 24:633-638.
187. Peiser, M., A. Becht, and R. Wanner. 2007. Antibody blocking of MHC II on human activated regulatory T cells abrogates their suppressive potential. *Allergy* 62:773-780.
188. Zijlstra, M., M. Bix, N.E. Simister, J.M. Loring, D.H. Raulet, and R. Jaenisch. 1990. Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature* 344:742-746.
189. Taylor, P.A., R.J. Noelle, and B.R. Blazar. 2001. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med* 193:1311-1318.

190. Joffre, O., N. Gorse, P. Romagnoli, D. Hudrisier, and J.P. van Meerwijk. 2004. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood* 103:4216-4221.
191. Nguyen, V.H., S. Shashidhar, D.S. Chang, L. Ho, N. Kambham, M. Bachmann, J.M. Brown, and R.S. Negrin. 2008. The impact of regulatory T cells on T-cell immunity following hematopoietic cell transplantation. *Blood* 111:945-953.
192. Jones, S.C., G.F. Murphy, and R. Korngold. 2003. Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD425 T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response. *Biol Blood Marrow Transplant* 9:243-256.
193. Yuen-Shan Tsang, J., Y. Tanriver, S. Jiang, E. Leung, K. Ratnasothy, G. Lombardi, and R. Lechler. 2009. Indefinite mouse heart allograft survival in recipient treated with CD4(+)CD25(+) regulatory T cells with indirect allospecificity and short term immunosuppression. *Transpl Immunol*
194. Shlomchik, W.D., M.S. Couzens, C.B. Tang, J. McNiff, M.E. Robert, J. Liu, M.J. Shlomchik, and S.G. Emerson. 1999. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285:412-415.
195. Teshima, T., R. Ordemann, P. Reddy, S. Gagin, C. Liu, K.R. Cooke, and J.L. Ferrara. 2002. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med* 8:575-581.
196. Zhang, Y., W.D. Shlomchik, G. Joe, J.P. Louboutin, J. Zhu, A. Rivera, D. Giannola, and S.G. Emerson. 2002. APCs in the liver and spleen recruit activated allogeneic CD8+ T cells to elicit hepatic graft-versus-host disease. *J Immunol* 169:7111-7118.
197. Haniffa, M., F. Ginhoux, X.N. Wang, V. Bigley, M. Abel, I. Dimmick, S. Bullock, M. Grisotto, T. Booth, P. Taub, C. Hilkens, M. Merad, and M. Collin. 2009. Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med* 206:371-385.
198. Nguyen, V.H., R. Zeiser, D.L. Dasilva, D.S. Chang, A. Beilhack, C.H. Contag, and R.S. Negrin. 2007. In vivo dynamics of regulatory T-cell trafficking and survival predict effective strategies to control graft-versus-host disease following allogeneic transplantation. *Blood* 109:2649-2656.

199. Ermann, J., P. Hoffmann, M. Edinger, S. Dutt, F.G. Blankenberg, J.P. Higgins, R.S. Negrin, C.G. Fathman, and S. Strober. 2005. Only the CD62L⁺ subpopulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 105:2220-2226.
200. Nguyen, V.H., R. Zeiser, and R.S. Negrin. 2006. Role of naturally arising regulatory T cells in hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:995-1009.
201. Tadokoro, C.E., G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A.C. Lino, A. Maraver, J.J. Lafaille, and M.L. Dustin. 2006. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 203:505-511.
202. Dulude, G., D.C. Roy, and C. Perreault. 1999. The effect of graft-versus-host disease on T cell production and homeostasis. *J Exp Med* 189:1329-1342.
203. Di Rosa, F., and R. Pabst. 2005. The bone marrow: a nest for migratory memory T cells. *Trends Immunol* 26:360-366.
204. Kuroda, M.J., J.E. Schmitz, A. Seth, R.S. Veazey, C.E. Nickerson, M.A. Lifton, P.J. Dailey, M.A. Forman, P. Racz, K. Tenner-Racz, and N.L. Letvin. 2000. Simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes and cell-associated viral RNA levels in distinct lymphoid compartments of SIVmac-infected rhesus monkeys. *Blood* 96:1474-1479.
205. Letsch, A., U. Keilholz, G. Assfalg, V. Mailander, E. Thiel, and C. Scheibenbogen. 2003. Bone marrow contains melanoma-reactive CD8⁺ effector T cells and, compared with peripheral blood, enriched numbers of melanoma-reactive CD8⁺ memory T cells. *Cancer Res* 63:5582-5586.
206. Noonan, K., W. Matsui, P. Serafini, R. Carbley, G. Tan, J. Khalili, M. Bonyhadi, H. Levitsky, K. Whartenby, and I. Borrello. 2005. Activated marrow-infiltrating lymphocytes effectively target plasma cells and their clonogenic precursors. *Cancer Res* 65:2026-2034.
207. Zou, L., B. Barnett, H. Safah, V.F. Larussa, M. Evdemon-Hogan, P. Mottram, S. Wei, O. David, T.J. Curiel, and W. Zou. 2004. Bone marrow is a reservoir for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res* 64:8451-8455.

208. Takahata, Y., A. Nomura, H. Takada, S. Ohga, K. Furuno, S. Hikino, H. Nakayama, S. Sakaguchi, and T. Hara. 2004. CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp Hematol* 32:622-629.
209. Godfrey, W.R., D.J. Spoden, Y.G. Ge, S.R. Baker, B. Liu, B.L. Levine, C.H. June, B.R. Blazar, and S.B. Porter. 2005. Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood* 105:750-758.
210. Steiner, D., N. Brunicki, B.R. Blazar, E. Bachar-Lustig, and Y. Reisner. 2006. Tolerance induction by third-party "off-the-shelf" CD4+CD25+ Treg cells. *Exp Hematol* 34:66-71.
211. Steiner, D., N. Brunicki, E. Bachar-Lustig, P.A. Taylor, B.R. Blazar, and Y. Reisner. 2006. Overcoming T cell-mediated rejection of bone marrow allografts by T-regulatory cells: synergism with veto cells and rapamycin. *Exp Hematol* 34:802-808.
212. Cohen, J.L., and O. Boyer. 2006. The role of CD4+CD25hi regulatory T cells in the physiopathogeny of graft-versus-host disease. *Curr Opin Immunol* 18:580-585.
213. Wekerle, T. 2008. T-regulatory cells-what relationship with immunosuppressive agents? *Transplant Proc* 40:S13-16.
214. Sarween, N., A. Chodos, C. Raykundalia, M. Khan, A.K. Abbas, and L.S. Walker. 2004. CD4+CD25+ cells controlling a pathogenic CD4 response inhibit cytokine differentiation, CXCR-3 expression, and tissue invasion. *J Immunol* 173:2942-2951.
215. Edinger, M., P. Hoffmann, C.H. Contag, and R.S. Negrin. 2003. Evaluation of effector cell fate and function by in vivo bioluminescence imaging. *Methods* 31:172-179.
216. Edinger, M., Y.A. Cao, M.R. Verneris, M.H. Bachmann, C.H. Contag, and R.S. Negrin. 2003. Revealing lymphoma growth and the efficacy of immune cell therapies using in vivo bioluminescence imaging. *Blood* 101:640-648.

7 Anhang

Veröffentlichungen

Hoffmann, P., T.J. Boeld, R. Eder, **J. Albrecht**, K. Doser, B. Piseshka, A. Dada, C. Niemand, M. Assenmacher, E. Orso, R. Andreesen, E. Holler, and M. Edinger. 2006. Isolation of CD4+CD25+ regulatory T cells for clinical trials. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:267-274.

Harle, P., G. Pongratz, **J. Albrecht**, I.H. Tarner, and R.H. Straub. 2008. An early sympathetic nervous system influence exacerbates collagen-induced arthritis via CD4+CD25+ cells. *Arthritis Rheum* 58:2347-2355

Vortrag

J. Albrecht, T. Boeld, K. Doser, R. Eder, J. Stahl, R. Andreesen, J. Ermann, M. Edinger and P. Hoffmann. MHC-compatibility between conventional and regulatory T cells is required for suppression of allospecific T cell responses, 37. Annual Meeting of the German Society for Immunology; Sept. 2007; Heidelberg

Posterbeiträge

J. Albrecht, T. Boeld, K. Doser, R. Eder, J. Stahl, R. Andreesen, M. Edinger and P. Hoffmann. Influence of MHC disparity on the suppressive activity of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, 4th International Symposium on the Clinical Use of Cellular Product, March 2007; Regensburg

J. Albrecht, T. Boeld, K. Doser, R. Eder, J. Stahl, R. Andreesen, J. Ermann, M. Edinger and P. Hoffmann. MHC-compatibility between conventional and regulatory T cells is required for suppression of allospecific T cell responses, 37. Annual Meeting of the German Society for Immunology; Sept. 2007; Heidelberg

J. Albrecht, T. J. Boeld, K. Doser, R. Eder, J. Stahl, E. Typlt, R. Andreesen, J. Ermann, M. Edinger and P. Hoffmann. MHC-identity between conventional and CD4+CD25+ regulatory T cells is required for protection from lethal graft-versus-host disease , 34. Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation; March 2008; Florence

J. Albrecht, K. Doser, R. Andreesen, J. Ermann, M. Edinger and P. Hoffmann. Only MHC-Identical Donor CD4+CD25+ Regulatory T Cells Convey Full Protection from Lethal Graft-Versus-Host Disease, 2008 Annual Meeting of the American Society of Hematology; Dec. 2008; San Francisco, USA

J. Albrecht, K. Doser, R. Andreesen, J. Ermann, M. Edinger and P. Hoffmann. Only MHC-identical donor CD4+CD25+ regulatory T cells convey full protection from lethal GVHD, 5th International Symposium on the Clinical Use of Cellular Products, March 2009; Nürnberg

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Daten und Konzepte sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den _____

(Julia Albrecht)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Matthias Edinger und Dr. Petra Hoffmann danke ich für die Betreuung der Arbeit, für die Diskussionsbereitschaft und die vielen Anregungen während der gesamten Zeit. Vor allem bedanke ich mich für die Möglichkeit der Teilnahme an internationalen Kongressen, um meine Ergebnisse zu präsentieren und wertvolle Erfahrungen zu sammeln.

Herrn Prof. Reinhard Andreesen danke ich für die Möglichkeit zur Anfertigung der Dissertation in der Abteilung für Hämatologie/Onkologie. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen und initiierten Aktivitäten trugen wesentlich zum Gelingen und Wohlfühlen in der Abteilung bei.

Prof. Susanne Modrow danke ich für die Übernahme der Betreuung der Dissertation seitens der biologischen Fakultät.

Herrn Thomas Schubert und Corinna Vogel aus der Abteilung für Pathologie, danke ich für die Beurteilung der histologischen Untersuchungen und Anfertigung der histologischen Bilder.

Ein ganz besonderer Dank gilt der Arbeitsgruppe „AGEdiHoff“: Kristl (vielen Dank für die Proseccolieferung ins Labor und die ein oder andere Zigarettenpause), Anna, Eva, Rüdi, Katrin (vielen Dank fürs Korrekturlesen), Jacki, Gabi, Claudia, Jasmin, Tina, Monika und Leo. Vielen Dank für die tolle Arbeitsatmosphäre und Eure Unterstützung. Es war immer eine „Gaudi“ mit Euch (obwohl 83% keine Niederbayern sind!). Ich werde Euch vermissen!

Ein herzliches Dankeschön geht an Barbara, Maja und Claudi, für Ihre aufmunternden Worte und die lustigen Kaffeepausen.

Natürlich möchte ich mich auch bei meinen Freunden Anne, Uli, Bine, Simon, Steffi, Josch und Gustl bedanken, die immer ein offenes Ohr hatten und immer für mich da waren. Ein riesengroßes Dankeschön geht an Uli für die Korrektur dieser Arbeit (wo wären meine Kommas nur ohne Dich?!).

Zu guter Letzt möchte ich mich in besonderem Maße bei meiner Familie und vor allem bei meinem Freund Manuel für all die Unterstützung bedanken die Sie mir entgegengebracht haben. Ihnen verdanke ich das Meiste.

